

KASVIPATOGEENIN *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV.
TOMATO DC3000 -BAKTEERIN TUOTTAMIEN HOP-
EFEKTORIPROTEIINIEN MERKITYS TAUDIN
SYNTYYN

Marjo Nissinen

Helsingin yliopisto

Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta

PRO GRADU -TUTKIELMA

Maaliskuu 2018

SISÄLLYS

1 JOHDANTO.....	4
2 <i>PSEUDOMONAS</i>-SUVUN KASVIPATOGEENIT JA <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. <i>TOMATO</i> DC3000 -BAKTEERI.....	6
2.1 <i>Pst</i> DC3000 -bakteerin tautimekanismit.....	7
3 <i>Pst</i> DC3000 -BAKTEERIN PROTEIINIEN ERITYSMEKANISMIT.....	10
3.1 Tyypin III -eritysmekanismi, T3SS.....	11
3.2 T3SS-mekanismin efektoriproteiinit.....	16
3.2.1 Efektoriproteiinit ja kasvien immuunipuolustus.....	17
3.2.2 HopAO1.....	19
3.2.3 HopM1.....	21
3.2.4 HopD1.....	22
4 MuA-TRANSPOSITIOKOMPLEKSI ELI TRANSPOSOSOMI.....	25
5 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT.....	28
6 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	29
6.1 Käytetyt bakteerikannat ja kasvatusolosuhteet.....	29
6.2 Plasmidit.....	29
6.3 DNA-menetelmät ja reagenssit.....	31
6.4 MuA-transpositiokompleksin valmistus.....	31
6.4.1 Transposonin eristys, puhdistus ja konsentrointi.....	31
6.4.2 Transpositiokompleksin kokoaminen.....	32
6.4.3 Transpositiokompleksien konsentrointi.....	32
6.5 Mutanttikirjaston valmistus.....	33
6.5.1 Elektrokompenttien solujen valmistus ja elektroporaatio.....	34
6.5.2 Transposoni-insertiikirjaston valmistus.....	34
6.6 Sisäkkäiset alukkeet kirjaston seulonnassa.....	35
6.6.1 <i>Hop</i> -mutanttien eristäminen kirjastosta.....	38
6.7 <i>Hop</i> -mutanttien virulenssitestaus tomaattien taimilla.....	38

7 TULOKSET.....	41
7.1 Kirjaston PCR-seulontamenetelmän optimointi.....	41
7.2 Transposoni-insertioiden seulonta.....	42
7.3 <i>HopD1</i>, <i>hopAO1</i> ja <i>hopM1</i>-geenien vaikutus <i>Pst</i> DC3000 -bakteerin taudin- aiheutuskykyyn tomaatin taimissa.....	45
7.3.1 <i>HopM1</i>-mutantin taudinaiheutuskyky.....	47
7.3.2 <i>HopAO1</i>-mutantin taudinaiheutuskyky.....	48
7.3.3 <i>HopD1</i>-mutantin taudinaiheutuskyky.....	48
 8 TULOSTEN TARKASTELU.....	50
 9 KIITOKSET.....	55
 10 LÄHTEET.....	56
 11 LIITTEET.....	69
Liite 1. Kukka-transposonin (KTn) sekvenssi ja siihen sitoutuvat alukkeet.....	69
Liite 2. MuA-transpositiokompleksin valmistusohje.....	70
Liite 3. <i>Pst</i> DC3000 -bakteerin <i>hopD1</i>, <i>hopAO1</i> ja <i>hopM1</i>-geenien sekvenssit sekä niihin suunnitellut alukkeet ja KTn-transposonin insertiokohta sekvenssissä.....	74
Liite 4. <i>Pst</i> DC3000 -bakteerin <i>hopD1</i>, <i>hopAO1</i> ja <i>hopM1</i>-mutanttien sekvensointi- näytteiden tulokset ja KTn-transposoni-insertiokohta sekvenssissä.....	77

LYHENTEET

Avr	avirulenssiproteiini (avirulence protein), joka on vanha nimitys nykyisin käytettävälle Hop-proteiini nimelle
bp	emäspari (base pair)
CEL	konservoitunut efektorigeenien lokus (conserved effector locus)
CFU	pesäkkeitä muodostava yksikkö (colony-forming unit)
cv.	kasvilajike (cultivar)
DNA	deoksiribonukleiinihappo
ETI	efektoriproteiinien laukaisema immunitetti (effector-triggered immunity)
Hop	Hrp ulkopuolen proteiini (Hrp outer protein) eli kaikki proteiinit, jotka eritetään bakteerin ulkopuolelle T3SS eli Hrp-mekanismin kautta
HR	hypersensitiivinen reaktio
Hrp	hypersensitiivinen vaste ja patogeenisuus
HrpA	Harpin-proteiini A
LRR	leusiinirikas toistojakso (leucine-rich repeat)
MAPK	mitogeeni-aktivoitunut proteiinkinaasi
MuA	bakteriofagi Mu:n transposaasi proteiini A
PAI	patogeenisuusaareke (pathogenicity island)
PAMP	taudinaiheuttaja mikrobien molekyyliarakenteet (pathogen-associated molecular pattern)
PCR	polymeraasiketjureaktio
PRR	toistokuvioita tunnistava reseptori (pattern recognition receptor)
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
PTI	PAMP-rakenteiden laukaisema immunitetti (PAMP-triggered immunity)
Pv.	patovariantti eli patotyyppi (pathovar)
R	kasvin resistenssiproteiini tai -geeni
ROS	kasvin oksidatiivinen purkaus (reactive oxygen species)
SA	salisyylihappo (salicylic acid)
Tn	transposoni
T1SS-T6SS	tyypin I-VI proteiinien eritysmekanismit (type I-VI secretion system)
V.C.	elävien solujen lukumäärä (viable cell count)
WT	villityyppi (wild type)

1 JOHDANTO

Tomaatilla bakteeriperäisen täplätaudin (bacterial speck) aiheuttava kasvipatogeeni *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 -bakteeri (*Pst* DC3000) on suosittu malliorganismi, koska sen koko genomi on sekvensoitu (Buell ym. 2003). *Pst* DC3000 -bakteerin taudinaiheutuskyvyllä välttämätön on sen tyypin III eritysmekanismi (T3SS), jonka kautta se ruiskuttaa suoraan kasvisolun solulimaan useita erilaisia Hop-efektoriproteiineja (Xin & He 2013). Toiminnallisia Hop-efektoriproteiineja on 28, joilla on osittain päällekkäisiä tehtäviä (Chang ym. 2005). Tästä syystä usein yhden efektoriproteiinin puutos ei vielä vaikuta bakteerin taudinaiheutuskykyyn ja yksittäisen efektorin vaikutusta kasvisolussa on vaikeampi tutkia. Efektoriproteiinien tehtävänä on estää kasvin immuunipuolustuksen eri osia. Kasvin aikaisen vaiheen immuunipuolustuksen, PTI-reaktion (PAMP-triggered immunity), laukaisee bakteerin konservoituneet PAMP-rakenteet (Pathogen-Associated Molecular Pattern), kuten flagellan rakenneproteiinit. Toisen vaiheen immuunipuolustuksessa, ETI-reaktio (Effector-triggered immunity), efektoriproteiinit toimivat laukaisevana tekijänä. ETI-reaktioon liittyen on käynnissä jatkuva evolutiivinen kilpavarustelu bakteerien ja kasvien välillä. Bakteerit hankkivat itselleen uusia efektoriproteiineja mm. horisontaalisen geenin siirron kautta ja kasvit taas kehittävät uusia resistenssiproteiineja (R) efektoriproteiineja vastaan (Dodds & Rathjen 2010, Xin & He 2013).

Tässä työssä haluttiin selvittää *Pst* DC3000 -bakteerin erittämien Hop-efektoriproteiinin vaikutusta sen taudinaiheutuskykyyn tekemällä deleetiomutantteja Hop-efektoriproteiineista MuA-transpositiomekanismilla. Transposoni-insertiokirjasto on tehokas tapa tutkia bakteerigenomin geenien toimintaa ja vaikutuksia bakteerin fenotyyppiin. Suurin osa transpositioon perustuvista menetelmistä tapahtuu *in vivo* eli elävissä eliöissä, mutta nykyisin on saatavilla myös useita *in vitro* eli koeputkessa tapahtuvia menetelmiä. *In vitro* -menetelmien etuna on, etteivät ne valikoi kohdeisäntää lainkaan (Haapa 1999a). *In vitro* bakteriofagi Mu:n transpositioon perustuvan menetelmän on todistettu olevan tehokas tapa valmistaa mutanttikirjasto (Lamberg ym. 2002, Pajunen ym. 2005). Sillä on korkea transpositiofrekvenssi, jolloin saadaan koko kohdebakteerin genomi mutatoitua kattavasti kirjastoon (Haapa 1999a). Menetelmässä kootaan MuA-transpositiokompleksi *in vitro*, joka sisältää transposonin ja sen päihin on sitoutuneena neljä MuA-proteiinia. Kompleksi viedään elektroporaatiolla kohdebakteerin soluihin, jossa se integroituu sattumanvaraisesti isäntäbakteerin genomiin (Lamberg ym. 2002). Mu-transpososomin on todettu jakautuvan tasaisesti kohdesekvensseihin eli sillä

on hyvin matala sekvenssispesifisyys. Nämä ovat keskeisiä hyvän mutageneesimenetelmän ominaisuuksia (Haapa 1999a, Haapa-Paananen ym. 2002).

2 *PSEUDOMONAS*-SUVUN KASVIPATOGEENIT JA *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TOMATO* DC3000 -BAKTEERI

Pseudomonas-suvun bakteerit kuuluvat Proteobakteerien pääjakson gammaluokan ja *Pseudomonadales*-lahkon *Pseudomonadaceae*-heimoon. *Pseudomonas*-suvun bakteerit ovat gram-negatiivisia sauvoja, jotka eivät tuota itiöitä. Niillä on yksi tai useampi polaarinen flagella, jonka avulla ne pystyvät uimaan isäntäsolunsa luo. Useimmat niistä, kuten *Pseudomonas syringae*, tuottavat keltavihreää fluoresoivaa pigmenttiä, pyoverdiiniä. Pyoverdiini on siderofori, joka sitoo bakteerin elinympäristöstä niukasti saatavilla olevaa rautaa (Jones ym. 2007, Preston 2000, Xin & He 2013). Keskeisiä kasvipatogeenejä ovat kasvien lehdissä ja hedelmissä nekroottisia leesioita tai värimuutoksia sekä erilaisia puun rungon kasvaimia aiheuttavat *P. syringae* -bakteerin eri patotyyppit (pathovar, pv.) (Mansfield ym. 2012), joita on lähes 50 (Gardan ym. 1999). Patotyyppi-jaottelu perustuu bakteerikannan/kantojen kykyyn infektoida eri kasvilajeja. Esimerkiksi *P. syringae* pv. *tomato* pystyy infektoimaan tomaattia, mutta ei *P. syringae* pv. *glycinea* -bakteerin isäntäkasvia soijapapua. Patotyyppit jaotellaan vielä edelleen eri muotoihin (race) riippuen siitä, mitä kasvilajiketta (cultivar) ne infektoivat. Bakteerin erittämät Hop-efektoriproteiinit vaikuttavat siihen mitä kasvilajikkeita patotyypin tietty muoto pystyy infektoimaan. Esimerkiksi tietyt tomaattilajikkeet ovat resistenttejä tietyille *P. syringae* pv. *tomato* -bakteerin muodoille (Lindeberg ym. 2009). Bakteerin Hop-efektoriproteiinien ja kasvin niitä vastaavien resistenssigeenien (R) valikoima saattaa osaltaan vaikuttaa myös patotyyppi-kasvilaji-luokitteluun (Wroblewski ym. 2009), tosin kaikkia tähän vaikuttavia tekijöitä ei ole vielä selvitetty (Ichinose ym. 2013). Eri patotyypeillä voi myös olla osittain samoja kasvi-isäntiä: esim. pavun lehtilaikkubakterioosia aiheuttava *P. syringae* pv. *phaseolicola* ja *P. syringae* pv. *syringae* molemmat infektoivat papua (Vinatzer & Monteil 2014). Muita *Pseudomonas*-suvun keskeisiä kasvipatogeenejä ovat mm. oliivipuun kasvaimia aiheuttava *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Rodríguez-Palenzuela ym. 2010, Mansfield 2012) ja kasvimätää (soft rot) varsissa ja versoissa esim. porkkanassa aiheuttava *Pseudomonas marginalis* (Godfrey & Marshall 2002).

P. syringae pathovar *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) -bakteeri aiheuttaa tomaatilla bakteeriperäisen täplätaudin (bacterial speck), jossa tomaatin hedelmiin ja lehtiin tulee nekroottisia mustia täpliä. *Arabidopsis thaliana* -kasvilla tauti ilmenee värimuutoksina lehdissä. Jos bakteerista inaktivoidaan *hopQI-1*-geeni, se pystyy infektoimaan myös *Nicotiana benthamiana* -tupakkakasvin (Wei ym. 2007). Vastustuskykyisissä kasveissa

bakteeri aiheuttaa hypersensitiivisen reaktion (HR), jossa kasvi puolustautuu nopealla ohjelmoidulla kasvisolujen kuolemisella infektiokohdassa. Infektiolähteenä ovat saastuneet kasvin siemenet tai maaperä, jossa bakteeri on säilynyt kuolleen kasvijätteen joukossa. Bakteeri leviää edelleen aerosoleissa ja veden mukana (Preston 2000). *P. syringae* -bakteeria on löydetty kasvinviljelyalueiden lisäksi mm. pilvistä, joista ja lumihangista (Morris ym. 2008). Joillakin *P. syringae* -bakteereilla myös hyönteiset toimivat vektoreina, kuten *P. syringae* pv. *syringae* B728a -kannalla herneen kirva toimii sekä isäntänä että vektorina. *Pst* DC3000 -bakteerilla samaa ominaisuutta ei ole löydetty (Stavrínides ym. 2009). Tartuntoja voi ehkäistä käyttämällä bakteerille resistenttejä tomaattilajikkeita, ennaltaehkäisevillä kuparisumutteilla sekä lehtien liiallisen kosteuden ehkäisyllä. Viileät lämpötilat (alle 21°C) ja pitkäaikainen kosteus edesauttavat taudin kehittymistä (Preston 2000).

Tomaatin täplätauti on löydetty ensimmäisenä U.S.A:sta vuonna 1933 (Bryan 1933), mutta vasta 1970-luvulla tautitapauksia tuli enemmän ilmi ympäri maailmaa mahdollisesti tietoisuuden lisääntyttyä kyseisestä taudista. Suurin osa viljelysten tomaatti-infektioiden aiheuttajista kuuluu *P. syringae* pv. *tomato* T1 tai JL1065 -bakteerikantoihin. *Pst* DC3000 -bakteerikannan aiheuttamia luonnossa esiintyviä infektoita on raportoitu vain harvoista paikoista (Vinatzer & Monteil 2014). *Pst* DC3000 -bakteeri on valikoitunut tutkimusten kohteeksi osittain siksi, että sen koko genomi on sekvensoitu jo 2003 (Buell ym. 2003), kun taas T1-kannan genomi osittain sekvensoitiin (draft-sequenced) vasta 2009 (Almeida ym. 2009). Sen lisäksi *Pst* T1 -bakteerikanta ei pysty infektoimaan suosittua kasvien malliorganismia lituruohoa. Näiden kahden bakteerikannan genomit ovat hyvin samankaltaisia, mutta Hop-efektoriproteiinien kokoelma on hyvin erilainen (Almeida ym. 2009, Vinatzer & Monteil 2014). Muita *P. syringae* -bakteerikantoja, joiden koko genomi on sekvensoitu, ovat papua infektoivat *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (*Pph*) (Joardar ym. 2005) ja *P. syringae* pv. *syringae* B728a (*Psy*) -bakteerit (Feil ym. 2005).

2.1 *Pst* DC3000 -bakteerin tautimekanismit

Pst DC3000 -bakteerin geeneistä n. 5 % liittyy taudin aiheuttamiskykyyn (Buell ym. 2003). Kasvien immuunipuolustuksessa on useita tekijöitä estämässä bakteerien invaasiota, jolloin vastavuoroisesti patogeeniset bakteerit tarvitsevat useita virulenssitekijöitä. *Pst* DC3000 -bakteerilla on kaksi peritrikkistä flagellaa, joiden avulla

se ui kemotaksissignaalien suuntaan ja löytää isäntäsolun. Tosin *Pst* DC3000 -bakteerin flagellojen liikkuvuus on melko alhainen verrattuna muihin *P. syringae* -kantoihin, eikä sen flagellojen poiston ole havaittu oleellisesti vaikuttavan taudinaiheutuskykyyn (Ichinose ym. 2013). Sen on kuitenkin havaittu liikkuvan lehden pinnalla mieluummin kohti auki kuin kiinni olevaa ilmarakoa (Melotto ym. 2006). Kosteissa olosuhteissa bakteerit käyttävät kasvin pinnalla liikkumisessa enemmän flagellaa ja kuivemmissä olosuhteissa IV-tyyppin pilusta. Kasvin apoplasti- eli soluvälitilassa nesteitä on vähemmän, jolloin ne tarvitsevat liikkumiseen sekä IV-tyyppin pilusta että myös flagellaa. Bakteri kiinnittää itsensä kasvin pinnalle sekä apoplastitilassa solujen pinnalle IV-tyyppin pilusten, viskoosien solunulkopuolisten/eksopolysakkaridien (EPS) ja filamenttimaisen hemagglutiniinin (FHA) avulla. Ne toimivat myös biofilmin muodostuksessa sekä bakteerin suojaamisessa ympäristön aiheuttamalta stressiltä. Biofilmi, joka on pinnoilla kasvava liman ympäröimä bakteeripopulaatio, suojaa niitä myös kemiallisilta torjunta-aineilta ja antibiooteilta (Ichinose ym. 2013, Xin & He 2013).

Bakteerit kasvavat ensin epifyytteinä kasvin lehden pinnalla ja tunkeutuvat sitten kasviin sisälle joko vauriokohdan tai lehden ilmarakojen kautta. *Pst* DC3000 -bakteeri on melko heikko epifyytti verrattuna muihin *P. syringae* -kantoihin. Kasvin pinnalla se kuolee alle kahdessa vuorokaudessa, jollei se pääse tunkeutumaan kasvin apoplastitilaan (Boureau ym. 2002). Tämä voisi johtua sen huonosta UV-valon sietokyvystä ja DNA:n korjausmekanismeista, mutta asiaa ei ole lähemmin tutkittu. Kosteat ja viileät olosuhteet edesauttavat bakteerin pääsyä sisälle kasviin. Useilla *P. syringae* -kannoilla on jäänmuodostusominaisuus (ice nucleation), jonka ansiosta jääkiteet pystyvät muodostumaan korkeammissa lämpötiloissa kuin normaalisti, aiheuttaen paleltumia ja rikkomaan kasvin pintaan sisäänpääsyreitit. *Pst* DC3000 -bakteerilta tämä ominaisuus puuttuu (Preston 2000, Hirano & Upper 2000).

Bakteerien tunkeutumisessa kasviin sisälle ovat keskeisiä sen 5-6 erilaista proteiinien eritysmekanismia, joiden avulla kasvisoluun viedään ns. efektoriproteiineja sekä mm. erilaisia toksineja ja entsyymejä. Näistä tärkeimpiä on tyyppin III eritysmekanismi (T3SS), jonka kautta *Pst* DC3000 -bakteeri vie kasviin 28 erilaista efektoriproteiinia. Efektoriproteiinien tehtävänä on estää kasvin immuunipuolustuksen eri osia. Tyyppin II eritysmekanismiin (T2SS) kautta bakteeri erittää kasvin soluseinää hajottavia entsyymejä, kuten sellulaaseja. Proteiinien eritysmekanismeja ja niiden kautta vietäviä

efektoriproteiineja ja muita yhdisteitä käsitellään tarkemmin luvussa 3. ja 3.2. (Xin & He 2013).

Päästyään kasviin sisälle alkavat bakteerit lisääntyä kasvin soluvälitilassa. *Pst* DC3000 -bakteeri on hemibiotrofinen eli bakteerit lisääntyvät voimakkaasti kasvin soluvälitilassa, mutta eivät heti tapa kasvisoluja. Kasvisolut alkavat kuolla vasta bakteerien määrän ollessa lähes huipussaan. Taudille tyypilliset oireet aiheutuvat usein bakteerin erittämistä toksineista. *Pst* DC3000 -bakteeri erittää koronatiini-toksiinia, jolla on useita tärkeitä vaikutuksia patogeenisissä. Se avustaa mm. bakteerien pääsyssä kasvin ilmaraoista sisään, auttaa bakteereita lisääntymään ja leviämään myös kasvin ei-infektoituneisiin osiin sekä aiheuttaa taudille tyypilliset oireet (Ichinose ym. 2013, Xin & He 2013). Pystyäkseen lisääntymään kasvissa bakteerien täytyy saada myös ravinteita ympäristöstään. Niukasti saatavilla olevan raudan sitomiseen bakteerilla on käytössä kolme sideroforia; pyoverdiini, yersiniabaktiini ja sitraatti. Nisäkässoluissa sideroforit ovat keskeisiä virulenssitekijöitä bakteereille, mutta *Pst* DC3000 -bakteerin taudinaiheutuskykyyn niiden poistolla ei ollut kuitenkaan mitään vaikutusta. Niiden vaikutusta kasvipatogeenien virulenssille täytyy vielä tutkia (Jones & Wildermuth 2011, Jones ym. 2007). Kasvien ja kasvipatogeenien välinen taistelu on niin monimutkainen prosessi, että kaikkia *Pst* DC3000 -bakteerin virulenssimekanismeja ei edelleenkään täysin tunneta.

3 *Pst* DC3000 -BAKTEERIN PROTEIINIEN ERITYSMEKANISMIT

Bakteerit ovat kehittäneet erilaisia virulenssiproteiinien erityismekanismeja, mitä ne voivat hyödyntää isäntäsolujensa infektoinnissa. Proteiinit voidaan erittää joko suoraan kohdesolun sisälle, solunulkopuoliseen nesteeseen tai proteiinit voivat jäädä kiinni bakteerin pinnalle. Gram-negatiivisten bakteerien proteiinien erityis solun ulkopuolelle vaatii kahden hydrofobisen kalvon läpäisemisen; solukalvon eli sisäkalvon sekä ulkokalvon, joka rajaa peptidoglykaania sisältävää periplasmista tilaa (kuva 1.). Gram-negatiivisilla bakteereilla on tunnistettu kuusi erilaista erityismekanismia, jotka on nimetty tyyppin 1-6 erityismekanismeiksi, T1SS (type 1 secretion system) -T6SS (Costa ym. 2015). *Pst* DC3000 -bakteerin genomi sisältää geenit kaikille kuudelle erityismekanismille, mutta tutkimuksissa on löydetty ainoastaan T2SS ja T3SS-mekanismien kautta eritetyjä virulenssiproteiineja (Xin & He 2013, Cunnac ym. 2009). *P. syringae* -bakteerin T2SS-mekanismi toimii yhteistyössä Tat-mekanismin kanssa. Niiden kautta kasviin erittyy kahta fosfolipaasi C -proteiinia, PlcA1 ja PlcA2, sekä mahdollisesti myös kasvin soluseinää hajottavia entsyymejä, pektiinilyaasia ja sellulaaseja. T2SS ja Tat-mekanismit ovat oleellisia *Pst* DC3000 -bakteerin taudinaiheutuskyvyille. Mutaatiot niissä estivät mm. sideroforien ja fosfolipaasien toimintaa. Bakteerin täytyy ensin saada rikottua sellulaaseilla ja pektiinilyaaseilla kasvin soluseinää, jotta se pääsee erittämään kasviin sisälle muita virulenssiproteiineja (Bronstein ym. 2005, Xin & He 2013). T3SS-mekanismia ja sen efektoriproteiineja käsitellään tarkemmin luvuissa 3.1. ja 3.2.

T6SS-mekanismin kautta *Pst* DC3000 -bakteeri erittää Hcp2 (hemolysin coregulated) -proteiinia. Hcp2-proteiinin on havaittu auttavan bakteeria kilpailussa elintilasta muiden mikro-organismien kanssa, kuten kasvin sekundaari-infektioita aiheuttavien hiivojen kanssa. Varsinaisia virulenssiproteiineja ne eivät ole, koska niiden poistamisella ei havaittu vaikutusta bakteerin taudinaiheutuskykyyn (Haapalainen ym. 2012). T6SS-mekanismi on löydetty viimeisimpänä erityismekanismeista (Pukatzki ym. 2006) ja Hcp1 ja Hcp2-proteiinien luokittelusta itse erityismekanismien rakenneosaproteiineiksi tai sekreetioproteiineiksi on vielä epävarmuutta. Niitä löytyy kaikkien bakteerien T6SS-kompleksista, joten lajispesifisiä proteiineja ne eivät ainakaan ole (Hood ym. 2010).

Tyyppien I, IV ja V -mekanismien geenit löytyvät *Pst* DC3000 -bakteerin perimästä. *Pst* DC3000 -bakteerin genomissa on 15 ABC-kuljetusmekanismien geenit eli T1SS-mekanismien, joita se käyttää ravinteiden saantiin kasvilla. Näiden on arveltu liittyvän kasvin sokerien kuljetukseen, kuten arabinoosin, ksyloosin ja riboosin. *Pst* DC3000 -bakteerilla on laajempi kapasiteetti sokerien kuljetukseen kuin aminohappojen (Buell ym. 2003). Toiminnallista T4SS-mekanismia ei ole toistaiseksi löydetty *Pst* DC3000 -bakteerilta, vaikka sen perimässä onkin geenit T4SS-mekanismiin (Buell ym. 2003). Yleensä bakteerit käyttävät T4SS-mekanismia mm. efektoriproteiinien vaihtoon (Costa ym. 2015). Kasvipatogeenisillä bakteereilla T5SS-mekanismien proteiinien eritystä ei ole juurikaan tutkittu.

3.1 Tyypin III eritysmekanismi (T3SS)

Gram-negatiivisten bakteerien tyypin III proteiinien eritysmekanismi (T3SS) on keskeinen niiden taudinaiheutuskyvyille. Kaikki tunnetut kasvipatogeeniset *P. syringae* -bakteerit tarvitsevat toimivan T3SS-mekanismien taudin aiheuttamiseen (O'Brien ym. 2001). Sekä kasvi- että eläinpatogeenisillä bakteereilla on T3SS-mekanismi. Se on ensimmäiseksi löydetty eläinpatogeenisten *Yersinia*-bakteerien Yop-proteiinien tutkimuksen yhteydessä 1990 (Michiels ym. 1990). Itse eritysmekanismi on melko samankaltainen eri bakteereilla, mutta sen kautta eritettävät efektoriproteiinit ovat bakteereille lajispesifisiä ja vastaavat usein bakteerin isäntäkirjosta/repertuaarista ja vaikutuksista isäntäsolun toimintaan (Lindeberg ym. 2009). Efektoriproteiinit vaikuttavat usein isäntäsolun immuunipuolustuksen viestinvälitysketjujen eri kohtiin estäen niiden oikean toiminnan. Efektoriproteiinien erityksessä aktivoituu vasta, kun T3SS-kompleksin pilusrakenne on kiinnittynyt isäntäsoluun (contact-dependent secretion). Monien efektoriproteiinien sekreetioon tarvitaan lisäksi spesifisiä kaperoneja, jotka avustavat efektoriproteiinien laskostumisessa erityksen yhteydessä. Ne estävät mm. efektoriproteiinien laskostumisen solulimassa, jolloin ei-laskostuneet proteiinit mahtuvat ahtaaseen erityskanavaan (Costa ym. 2015, Ji & Dong 2015).

T3SS-kompleksi on ruiskua muistuttava rakenne, joka koostuu n. 20 proteiinista (kuva 1.). Kompleksi muistuttaa flagellakoneiston rakennetta ja kahdeksan sen sisäkalvon rengasrakenteen proteiineista onkin homologisia flagellakoneiston proteiinien kanssa (He 1997, kuva 1.). Kompleksissa on runko-osa, joka koostuu kahdesta bakteerin sisä- ja ulkokalvoon upotetusta rengasrakenteesta. Runko-osaan on kiinnittynyt filamenttimainen neularakenne, jonka päähän muodostuu translokoni. Translokoni on

proteiinirakenne, joka muodostaa kasvin solukalvon hydrofobisen osan läpi kanavan/reiän hydrofiilisten aineiden kuljetusta varten. Pitkää filamenttiosaa kutsutaan neularakenteeksi eläinpatogeeneilla ja pilusrakenteeksi kasvipatogeeneilla. Efektoriproteiinit eritetään onton runko- ja pilusosan läpi translokoinin tekemästä reiästä suoraan kasvin solulimaan (Costa ym. 2015, Gerlach & Hensel 2007, Izore ym. 2011, Ji & Dong 2015).

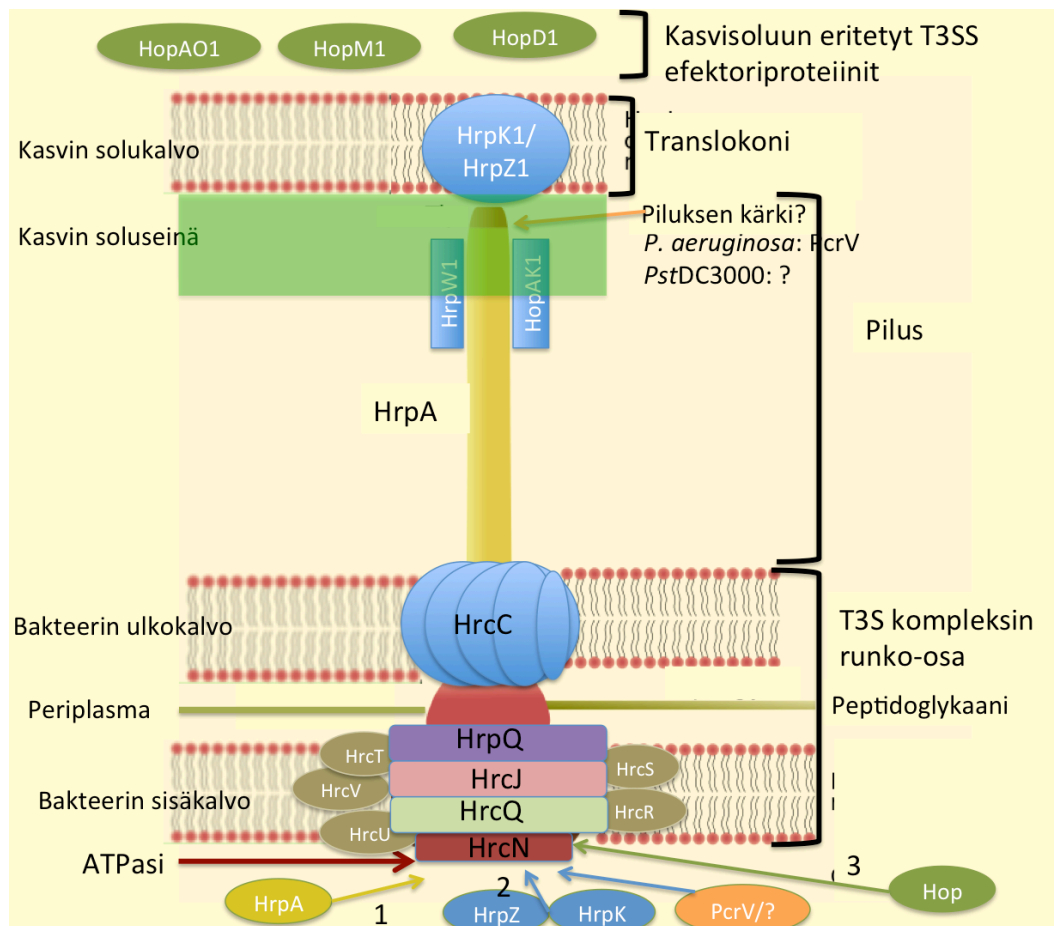
Kasvipatogeeneilla T3SS-proteiineja koodaa *hrp*-geeniklusteri, joka sijaitsee patogeenisuusaarekkeessa (pathogenicity island, PAI). Tämän takia kasvipatogeeneilla sitä kutsutaan myös Hrp-eritysmekanismitse eli hypersensitiivinen vaste ja patogeenisuus -mekanismitse (hypersensitive response and pathogenicity). Kasvipatogeeneilla *hrp*-geenien ekspressio aikaansaa resistensseissä kasveissa hypersensitiivisen reaktion ja vastustuskyvyttömillä kasveilla ne aiheuttavat taudin eli patogeneesin. Näistä *hrp*-geeneistä yhdeksän on konservoituneita eri kasvi- ja eläinpatogeenisten bakteerien geenien kesken, minkä takia niitä kutsutaan *hrc* (hypersensitive response and conserved) -geeneiksi. Nämä konservoituneet *hrc*-geenit ovat *hrcC*, *hrcJ*, *hrcN*, *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS*, *hrcT*, *hrcU*, *hrcV*. Lukuun ottamatta *hrcC*-geeniä, nämä geenit ovat myös flagellan geenien kanssa homologisia (Alfano ym. 2000, Alfano & Collmer 1997, He 1997, kuva 1.).

T3SS-mekanismien runko-osa muodostuu bakteerin sisäkalvon rengasrakenteen proteiineista HrpQ, HrcJ, HrcQ, HrcR, HrcS, HrcT, HrcU ja HrcV. HrcN tuottaa todennäköisesti energian sekreetioon, koska se muistuttaa rakenteeltaan oksidatiivisen fosorylaation F₀F₁-ATPaasia (Müller ym. 2006). HrcC on sekretiini, joka polymerisoituu ja muodostaa neulaa varten kanavan bakteerin ulkokalvon läpi. HrcC on kiinni sisäkalvon rengasrakenteessa ja muodostaa sen kanssa yhdessä T3SS-mekanismien runko-osan (kuva 1.). *HrcC* on konservoituneista geeneistä ainut, joka ei ole homologinen flagellan proteiinien kanssa (Alfano & Collmer 1997). Sekretiinejä käytetään myös T2SS-mekanismissa. *Pst* DC3000 -bakteerin pilusrakenne on ontto 6-8 nm leveä putki, joka koostuu T3SS-mekanismien runko-osan läpi eritettävistä HrpA-proteiinien alayksiköistä (Roine ym. 1997). Kasvien soluseinä on useimmiten vähintään 100 nm paksu, joten kasvipatogeenin *P. syringae* -bakteerin pilusrakenne voi olla jopa 2 µm pitkä. Eläinpatogeenisilla bakteereilla riittää lyhyempi n. 60-80 nm pitkä neularakenne (Ji & Dong 2015). Jos *Pst* DC3000 -bakteerista poistetaan *hrpA*-geeni, se ei pysty muodostamaan pilusrakennetta eikä myöskään aiheuttamaan tautia kasvilla (Roine ym. 1997).

Seuraavassa vaiheessa mekanismin kautta eritetään Harpin-proteiineja sekä translokaatioproteiinit HrpK1 ja HrpZ1, joiden tehtävänä on muodostaa reikä isäntäsolun solukalvoon. HrpK1 on pääkomponentti translokoinnissa ja voisi näin ollen vastata eläinpatogeeni *P. aeruginosa* -bakteerin PopB-translokoniproteiinia ja vastaavasti HrpZ1 PopD-proteiinia. Kasvipatogeenien translokoinnin muodostus ja siihen osallistuvien proteiinien ei kuitenkaan ole osoitettu olevan homologisia eläinpatogeenien kanssa (Bleves 2010, Choi ym. 2013, Izore ym. 2001, Kvitko ym. 2007). HrpJ säätelee translokoinnin muodostukseen osallistuvien HrpZ1, HrpK1, HrpW1 ja HopAK1-harpinproteiinien erityistä ja on välttämätön *Pst* DC3000 -bakteerin virulenssille. Harpin-proteiinit eli translokaattorit ovat apuproteiineja, jotka avustavat mm. efektoriproteiinien siirrossa. HrpW1 ja HopAK1 todennäköisesti avustavat pilusrakenteen työntymisessä kasvin soluseinän läpi sekä kasvin solukalvon hajotuksessa (Choi ym. 2013, Crabill ym. 2012). Eläinpatogeenisella *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerilla on neularakenteen kärjessä lisäksi PcrV-proteiini, jonka tehtävänä on mahdollisesti säädellä reiän muodostusta. Se ei kuitenkaan itse osallistu reiän tekoon, vaikka onkin osoitettu olevan välttämätön reiän muodostuksessa ja sitä kautta efektoriproteiinien erityksessä isäntäsoluun. Esimerkiksi PcrV:hen kohdennetut vasta-aineet antavat suojan *P. aeruginosa* infektiota vastaan (Bleves 2010). Vastaavaa piluksen kärkiosaa ei toistaiseksi ole löydetty kasvipatogeenisiltä bakteereilta.

Konservoituneet T3SS-kompleksin proteiinit viittaavat siihen, että ne ovat siirtyneet bakteereihin horisontaalisen geenin siirron kautta. T3SS-geeniklusterit ovat tällöin joko plasmideissa tai patogeenisuussaarekkeissa (PAI). *Pst* DC3000 -bakteerilla T3SS-mekanismissa koodaavat *hrp*-geenit sijaitsevat yhdessä kohtaa genomia, PAI-alueella. Efektoriproteiinien geenit eivät sen sijaan ole liitoksissa toisiinsa eri lajeilla, minkä avulla bakteerit voivat sopeutua isäntäänsä ja saada kilpailuetua muihin bakteereihin. Suurin osa *Pst* DC3000 -bakteerin toiminnallisista efektoriproteiineista (18 kpl) sijaitsee jossakin genomien kuudesta geeniklusterista I, II, IV, CEL eli konservoitunut efektorien locus (=VI, conserved effector locus), IX tai X. Geeniklusterit ovat lähellä Hrp PAI -saareketta, mutta loput efektoriproteiinit ovat pääsääntöisesti hajallaan ympäri genomia (Alfano ym. 2000, Baltrus ym. 2014, Kvitko ym. 2009). Bakteerit voivat hankkia uusia T3SS-efektoriproteiineja itselleen toisilta bakteereilta horisontaalisen geeninsiirron tai hiljentyneen efektoriproteiinin promootorin tai pseudogeenin kautta. Efektoriproteiinien G-C-pitoisuuksien erot sekä niiden hajautus ympäri genomia viittaa siihen, että niitä otetaan bakteeriin horisontaalisen geenin siirron kautta joko toisista *P.*

syringae -bakteereista tai jopa eri sukua olevista bakteereista (Alfano ym. 2000, Baltrus ym. 2014, Grant ym. 2006). *Pst* DC3000 -bakteerin genomissa on potentiaalia muuntumiseen, koska sen genomi sisältää 5-7 % profaageja, insertioelementtien (IS) transposaaseja ja muita liikkuvia geenielementtejä (Buell ym. 2003, O'Brien ym. 2011).



Homologiset T3SS rakenneproteiinit							
<i>Pst</i> DC3000	HrcC	HrpQ	HrcJ	HrpA	?	HrpK1?	HrpZ1?
<i>P. aeruginosa</i>	PscC	PscD	PscJ	PscF	PcrV	PopB?	PopD?
Flagella	-	FliG?	FliF	-	-	-	-
Toiminta	Runko-osa ulkokalvo	Runko-osa sisäkalvo	Runko-osa sisäkalvo	Pilus/Neula	Neulan kärki /translokoni	Translokoni	Translokoni
Homologiset T3SS rakenneproteiinit: eritysmekanismin osat							
<i>Pst</i> DC3000	HrcR	HrpS	HrcT	HrcU	HrcV	HrcQ	HrcN
<i>P. aeruginosa</i>	PscR	PscS	PscT	PscU	PcrD	PscQ	PscN
Flagella	FliP	FliQ	FliR	FliB	FliA	FliN/FliY	FliI
Toiminta	Runko-osa sisäkalvo	Runko-osa sisäkalvo	Runko-osa sisäkalvo	Runko-osa sisäkalvo	Runko-osa sisäkalvo	Runko-osa sisäkalvo	ATPasi

KUVA 1. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) -bakteerin tyypin III efektoriproteiinien eritysmekanismi. T3SS-mekanismin runko-osa koostuu kahdesta yhteenliitetystä rengasrakenteesta bakteerin ulko- ja sisäkalvoilla. Ensimmäinen vaihe (kohta 1) T3SS-mekanismin muodostuksessa on erittää piluksen rakenneproteiini HrpA runko-osan läpi. HrpA polymerisoituu ja muodostaa n. 2 µm pitkän pilusrakenteen todennäköisesti myös kasvin soluseinän läpi. Toisessa vaiheessa (kohta 2) runko-osan ja piluksen läpi eritetään translokoniin rakenneproteiinit HrpK1 ja HrpZ1 sekä *P. aeruginosa* -bakteerilla myös kärkiproteiini PcrV. Kasvipatogeeneilla vastaavaa kärkiproteiinia ei toistaiseksi ole löydetty. Viimeisessä vaiheessa (kohta 3) eritetään efektoriproteiinit ja toksinit suoraan kasvisolun sisälle translokoniin kasvin solukalvoon tekemän reiän kautta. Harpin-proteiinit HrpW, HopAK1 ja HrpJ avustavat reiän tekemisessä kasvin soluseinään ja efektoriproteiinien pääsemisessä kasvin solulimaan. Energia proteiinien eritykseen saadaan HrcN-ATPasista. Taulukkoon on koottu *Pst* DC3000 -bakteerin T3SS-mekanismin homologiset rakenneproteiinit eläinpatogeenisen *P. aeruginosa* -bakteerin T3SS-mekanismin kanssa sekä flagellan rakenteen kanssa. (Kuvan mallina käytetty Izore ym. 2011.)

3.2 *Pst* DC3000 -bakteerin T3SS-efektoriproteiinit

Kasvipatogeenien T3SS-mekanismia kutsutaan myös nimellä Hrp-mekanismi eli hypersensitiivinen vaste ja patogeenisuus -mekanismi (ks. luku 3.1.). *P. syringae* -bakteerit erittävät T3SS-mekanismin kautta kahdenlaisia proteiineja: Hop-efektoriproteiineja (Hrp outer protein), jotka eritetään kasvisoluun sisälle solulimaan ja kasvisolun ulkopuolella apoplastitilassa toimivia apuproteiineja, kuten Harpin-proteiineja (Hrp). Hop-efektoriproteiinilla tarkoitetaan virulenssiproteiineja, joiden määrä *Pst* DC3000 -bakteerilla on tällä hetkellä vakiintunut 28 tutkitusti toiminnalliseen efektoriproteiiniin (Chang ym. 2005, Cunnac ym. 2009, Xin & He 2013). Ensimmäinen efektoriproteiini löydettiin 1984. *Pst* DC3000 -bakteerin ensimmäinen karakterisoitu efektoriproteiini oli AvrE (Lorang & Keen 1995). Ensimmäisissä bioinformatiikan menetelmiä hyödyntävissä analyyseissa efektoriproteiinien määrä yliarvioitiin n. 35-60 kappaleeseen. Myöhemmin Chang ym. 2005 rajasi efektoriproteiinien määrän 28 kappaleeseen. *Pst* DC3000 -bakteerin genomissa on varsinaisten toiminnallisten efektorigeenien lisäksi 12 efektoripseudogeeniä ja seitsemän efektorigeeniä, joita ekspressoidaan vain heikosti (Chang ym. 2005, Cunnac ym. 2009, Kvitko ym. 2009). Efektoriproteiinien nimikkeistön yhtenäistämiseksi on koottu nimeämisohjeet uusille löydetyille efektoriproteiineille, sekä vanhojen nimien termit on selitetty PPI *Pst* DC3000 -kotisivuilla (http://www.pseudomonas-syringae.org/pst_home.html). Ensimmäiset löydetty efektoriproteiinit nimettiin Avr eli avirulenssiproteiineiksi, koska kasveilla oli geeni-geenistä puolustus näille. Uudempi ja suositeltava nimitys on Hop-efektoriproteiini (Lindeberg ym. 2005).

Kasvin solulimaan siirtymisessä efektoriproteiinit tarvitsevat Harpin-apuproteiineja, joita kutsutaan myös translokaattoreiksi. Aluksi myös Harpin-proteiinien luultiin olevan virulenssiproteiineja, mutta myöhemmissä tutkimuksissa selvisi, että niiden merkitys patogeenisissä liittyikin efektoriproteiinien avustukseen. Harpinit tekevät kasvin soluseinään ja solukalvoihin pieniä reikiä sekä sitoutuvat solukalvon lipideihin. Vieläkään ei ihan tarkkaan tiedetä kaikkia niiden tehtäviä patogeenisissä, vaikka ensimmäinen Harpin-proteiini on löydetty jo 1992 (Choi ym. 2013, Wei ym. 1992).

Hop-efektoriproteiinit ovat keskeisiä virulenssitekijöitä *Pst* DC3000 -bakteerille. Se tuottaa useita eri efektoriproteiineja, joilla on myös paljon päällekkäisiä tehtäviä. Yhden efektoriproteiinin menetyksellä ei välttämättä ole mitään merkitystä bakteerin taudinaiheutuskyvylle, mutta esimerkiksi kaksoismutantti $\Delta avrPto\Delta avrPtoB$

lisääntymiskyky kasvilla oli selkeästi huonontunut (Kvitko ym. 2009, Lin & Martin 2005). Päällekkäisten T3SS-efektoriproteiinien keräily saattaisi antaa bakteerille mahdollisuuden hävittää muutaman efektoriproteiinin kilpailussa kasvin immuunipuolustusta vastaan ilman, että sen virulenssi kärsii (Grant ym. 2006). Ne määräävät myös mitä isäntiä eri patovarianttiryhmiin kuuluvat *P. syringae* -bakteerit pystyvät infektoimaan (Lindeberg ym. 2009, ks. luku 2). Bakteerikantojen efektoriproteiinien kokoelma saattaa muuttua ajan kuluessa, koska niillä on yleensä 3-36 efektoriproteiinia, joita vaihdetaan mm. toisilta bakteereilta horisontaalisen geeninsiirron kautta ja joidenkin efektorigeenien deletoituminen saattaa jopa laajentaa isäntäkasvien määrää (Baltrus ym. 2014, Grant ym. 2006). Esimerkiksi HopQ1-1-efektoriproteiinin poisto *Pst* DC3000 -bakteerista tekee siitä virulentin myös *Nicotiana benthamiana* -tupakkakasville, joka ei normaalisti kuulu *Pst* DC3000:n kohdeisäntiin (Wei ym. 2007).

Pst DC3000 -bakteerin taudinaiheutuskyvyille välttämättömiä efektoriproteiineja näyttäisi olevan kahdeksan, AvrPtoB, HopM1, AvrE, HopE1, HopG1, HopAM1, HopAA1 ja HopN1. Cunnac ym. 2011 poistivat *Pst* DC3000 -bakteerilta ensin kyvyn tuottaa kaikkia 28 toiminnallista efektoriproteiina ja näillä kahdeksalla sen taudinaiheutuskyky palautui. HopM1, AvrE, HopAA1 ja HopN1-efektoriproteiinien geenit sijaitsevat konservoituneessa efektorilokuksessa (CEL) Hrp PAI eli patogeenisuussaareke geeniklusterin lähetyvyydessä (Kvitko ym. 2009). AvrE, HopM1 ja HopAA1-efektoriproteiinien geenit ovat konservoituneita muillakin *P. syringae* -bakteerikannoilla, mikä voisi viitata siihen, että ne ovat välttämättömiä myös niiden virulenssille (Baltrus ym. 2014, O'Brien ym. 2011). HopG1 sijaitsee geeniklusterissa IX ja loput näistä kahdeksasta efektoriproteiinista sijaitsevat hajallaan genomissa (HopAM1, avrPtoB ja HopE1) (Kvitko ym. 2009). Näistä kahdeksasta virulenssikyvyn palautukselle välttämättömästä efektoriproteiinista vain viiden toiminta tunnetaan: HopM1, AvrPtoB, HopN1, HopG1, HopE1 (kuva 2.). HopE1-efektorin toiminta on löydetty viimeisenä 2016 (Guo ym. 2016).

3.2.1 Efektoriproteiinit ja kasvien immuunipuolustus

Kasvien ensimmäinen vaihe immuunipuolustuksessa on patogeenin molekyyliarakenteen (PAMP, pathogen-associated molecular pattern) tunnistus kasvin solukalvolla olevien toistokuvioita tunnistavien reseptorien (PRR, pattern recognition receptor) avulla. Tätä kutsutaan patogeenirakenteen laukaisemaksi immunitetiksi eli PTI:ksi (PTI, PAMP-

triggered immunity). PAMP-rakenteita ovat bakteerin pinnan konservoituneet proteiimirakenteet, kuten flagellan Flg22-proteiini tai Elongaatiofaktori-Tu (EF-Tu) (Dodds & Rathjen 2010). Monet bakteerien efektoriproteiinit estävät kasvien PR-reseptorien normaalia toimintaa. Jotkut efektoriproteiinit, kuten HopU1 ja HopQ1, estävät PR-reseptorien synteesin (kuva 2.), toiset taas estävät PR-reseptoreita välittämästä keskeisiä aktivointisignaaleja eteenpäin, esim. mitogeeni-aktivoiduille proteiinikinaaseille (MAPK) (Dodds & Rathjen 2010, Macho & Zipfel 2015). AvrPtoB sekä AvrPto-efektoriproteiinit toimivat infektion alkuvaiheessa ja estävät kasvin PR-reseptoria tunnistamasta *Pst* DC3000 -bakteerin PAMP-rakenteita. Tällöin kasvin PTI-immuunipuolustuksen aktivoivat kinaasisignaalikaskadit eivät käynnisty ja bakteeri pääsee aloittamaan infektion. AvrPtoB-efektoriproteiinin vaikutus kohdentuu suoraan PR-reseptoriin, missä se voi joko hajottaa reseptorin proteasomissa tai inhiboida sen signaalinvälityskinaaseja (kuva 2.). Myös HopAO1-efektoriproteiini vaikuttaa infektion alkuvaiheessa kasvin PRR-tunnistukseen, mitä käsitellään tarkemmin luvussa 3.2.2. (Macho & Zipfel 2015).

Kasvien toinen vaihe immuunipuolustuksessa on solunsisäisten NB-LR-reseptoreiden eli nukleotidia-sitovia (NB, nucleotide-binding) leusiinirikkaita toistojaksoja sisältävien reseptoreiden (LRR, leucine-rich repeat receptor) bakteerin tietyn efektoriproteiinin tunnistus, jolloin ETI-reaktio käynnistyy eli efektoriproteiinien laukaisema immunitetti (ETI; effector triggered immunity) (kuva 2.). Kasvin resistenssiproteiinit (R) tunnistavat tietyn efektoriproteiinin ja hypersensitiivinen reaktio (HR) käynnistyy. ETI-reaktio on usein tehokkaampi kuin PTI-reaktio. Kasvin resistenssigeenit ja efektoriproteiinit käyvät jatkuvaa kilpavarustelua evoluutiossa ja niiden rakenteet vaihtelevat suuresti eri lajeilla. Esimerkiksi Cai ym. 2011 ovat löytäneet mutaation *hopM1*-geenistä, joka esti kasvin immuunipuolustusta tunnistamasta patogeenia. PTI-reaktion PR-reseptorit sen sijaan ovat usein konservoituneita eri lajien kesken (Dodds & Rathjen 2010). Virulenssille välttämätön HopE1 (Cunnac ym. 2011) estää PTI-reaktion lisäksi myös kasvin ETI-reaktion. Guo ym. 2016 osoittivat HopE1-efektoriproteiinin hajottavan kasvin mikrotubulusten liitokset vaikuttamalla kasvin MAP65-entsyymeihin. Kasvi tuottaa tällöin vähemmän PR-1-entsyymiä, jota tarvitaan PR-reseptorien synteesiin. HopE1 todennäköisesti siis estää kasvin PTI-reaktioon liittyvän solunulkopuolisen tunnistuksen (kuva 2.). Aiemmin osoitettiin HopZ1 (2009) efektoriproteiinin vaikuttavan myös kasvin mikrotubuluksiin, mikä viittaisi mikrotubulusten olevan keskeisiä kasvin immuunipuolustuksessa. Myös HopM1 estää sekä kasvin PTI-, että ETI-reaktion. Se

häiritsee kasvin vesikkeliön toimintaa, mikä on yleinen vaikutuskohde patogeenisillä bakteereilla (Lozano-Duran ym. 2014). HopM1-efektoriproteiinia käsitellään tarkemmin luvussa 3.2.3.

Muista virulenssille välttämättömistä efektoriproteiineista HopG1 vaikuttaa kasvin mitokondrioiden toimintaan ja HopN1 kloroplasteihin (kuva 2.). HopN1 on kysteiiniproteaasi, joka estää kasveja tuottamasta kalloosia ja ROS-reaktiota (ROS, reactive oxygen species) (Block ym. 2010, Rodríguez-Herva ym. 2012). Kaikkien virulenssille välttämättömien efektoriproteiinien (Cunnac ym. 2011) toimintaa ei vielä tunneta, kuten AvrE, HopAM1, HopAA1. Tosin AvrE näyttäisi toimivan yhdessä HopM1-efektoriproteiinin kanssa, josta tarkemmin kappaleessa 3.3.2.

Evoluutiosota kasvien ja bakteerien välillä on johtanut hyvin monimuotoisiin efektoriproteiineihin ja niitä vastaaviin kasvin resistenssiproteiineihin (R) sekä PR-reseptoreihin. Kaikki efektoriproteiinit yhdessä ovat keskeisiä bakteerin taudinaiheutuskyvylle, mutta yksittäiset efektoriproteiinit ovat usein korvattavissa. Usein yhden efektoriproteiinin puutos ei vaikuta bakteerin taudinaiheutuskykyyn, osittain varmaankin siksi että niillä on paljon päällekkäisiä tehtäviä. Tämän takia viljelyksillä kasvit usein menettävät infektiolta suojaavan R-geenin vaikutuksen muutaman vuoden kuluttua (Cunnac ym. 2009, Grant ym. 2006).

3.2.2 HopAO1

Kasvin ensimmäisen vaiheen immuunipuolustuksen, PTI-reaktion käynnistävät bakteerin PAMP-rakenteen tunnistavat solukalvon PR-reseptorit, jotka ovat reseptorikinaaseja (RK). Kasvin PR-reseptorit vastaavat eläinten luonnollisen immunitetin Toll-kaltaisia reseptoreja (toll-like-receptor, TLR). PR-reseptorit koostuvat yleensä kahdesta proteiinosasta (domeenista); solunulkopuolisesta leusiinirikkaasta toistojaksoja sisältävästä proteiinosasta (LRR, leucine-rich repeat) ja solunsisäisestä kinaasiosasta (kuva 2.). PR-reseptoriin on lisäksi kiinnittynyt ko-reseptoreita, säätelyproteiineja sekä solunsisäiseen signaalinvälitysketjuun liittyviä osia. BAK1-kinaasi (brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1) on keskeinen PTI-reaktion säätelyproteiini. Useimmat PR-reseptorien LRR-kinaasi-entsyymit vaativat aktivoitumiseensa tämän BAK1-säätelyproteiinin (Dodds & Rathjen 2010, Macho & Zipfel 2015).

PR-reseptorit voivat tunnistaa useita eri bakteerin PAMP-rakenteita, kuten bakteerin Flg22-flagelliiniproteiinin tunnistaa FLS2-PR-reseptori (flagellin sensing 2) ja

elongaatio-faktori-Tu-rakenteen tunnistaa EFR-PR-reseptori (elongation factor Tu receptor). Tunnistettuaan bakteerin flagellan rakenteen solunulkopuolisella LRR-osallaan FLS2-reseptori muodostaa BAK1-koreseptorin kanssa kompleksin ja tästä seuraa molempien proteiinien solunsisäisen kinaasiosan fosforylaatio. Tämän aktiivisen FLS2-BAK1 kompleksin signaalin voi solussa välittää eteenpäin joko solulimassa olevat Botrytis-indusoidut proteiinikinaasit, BIK1 (Botrytis-induced kinase 1) tai mitogeeni-aktivoitunut proteiinikinaasi, MAPK (mitogen-activated protein kinases) tai kalsiumiriippuvaliset proteiinikinaasit, CDPK (calcium-dependent protein kinases) (kuva 2.) (Dodds & Rathjen 2010). PR-reseptorien PAMP-tunnistuksen aloittamat MAP-kinaasien signaalinvälitysketjut ovat keskeisiä PTI-reaktiolle. HopF2 ja HopAI1-efektoriproteiinit estävät MAP-kinaasien toimintaa. HopF2 inhiboi MKK5-kinaasin toimintaa ja HopAI1 MPK3, 6 ja 4-kinaaseja. Näiden signaalinvälitysketjujen kohde on kasvin tumassa, jossa ne aktivoivat puolustukseen liittyvien geenien transkription. Tumassa voidaan tuottaa lisää PR-reseptoreja, antimikrobisia yhdisteitä sekä kalloosia kasvin soluseinään. HopU1 inhiboi posttranskriptiovaiheessa näiden puolustukseen tuotettujen lähetti-RNA-molekyylien sitoutumisproteiineja, GRP-7 ja GRP-8, jolloin tuotettu lähetti-RNA ei ole enää stabiili (Dodds & Rathjen 2010, Xin & He 2013).

Bakteerin efektoriproteiinit estävät näistä kasvin PTI-reaktion vaiheista eri kohtia päästäkseen aloittamaan infektion. HopAO1 (vanha nimi HopPtoD2) on tyrosiinifosfataasientsyymi (Bretz ym. 2003), joka kohdentuu PR-reseptoreihin samoin kuin AvrPto ja AvrPtoB. Tosin näillä kaikilla kolmella efektorilla on erilaiset estomekanismit ja eri PR-reseptorikohdat, mihin ne kukin vaikuttavat. HopAO1-efektorin fosfataasientsyymi pystyy poistamaan PR-reseptorin aktivointiin tarvittavat kinaasiosan fosfaatit, jolloin PTI-reaktion aktivointiin tarvittava signaalinvälitys katkeaa (kuva 2.). Se kohdentuu suoraan FLS2- ja EFR-reseptorien tyrosiinikinaasiosaan ja poistaa niistä fosfaatteja (Macho & Zipfel 2015, Macho ym. 2014, Guo ym. 2009). *Pst* DC3000 -bakteerin 27 efektoriproteiinin vaikutusta testattiin hiivaan, koska hiivalta puuttuu R-geenit ja jotkut efektorit vaikuttavat kaikilla eukaryooteilla oleviin universaaleihin kohtiin. Kun HopAO1 tyrosinifosfataasi- ja HopN1 kysteiniiniproteaasientsyymien toiminta estettiin, ne eivät pystyneet enää estämään hiivan kasvua (Munkvold ym. 2008).

Pst DC3000 -bakteerin virulenssitestauksissa *hopAO1*-deleetiomutantti lisääntymiskyky lituruohossa oli heikentynyt, mutta leesioiden tuotossa ja taudinaiheutuskyvyn ajoituksessa ei ollut eroa villityyppiin (Underwood ym. 2007, Macho ym. 2014).

Nicotiana benthamiana -kasvilla, joka ei ole *Pst* DC3000 -bakteerin luonnollinen isäntä, *hopAO1*-deleetiomutanttin lisääntymiskyky oli heikentynyt ja sen lisäksi myös taudinaiheutuskyky oli viivästynyt tai estynyt kokonaan (Espinosa ym. 2003, Bretz ym. 2003). Tosin *Nicotiana benthamiana* -kasvitesteissä *Pst* DC3000 -bakteerin IX-geeniklusterin poistolla ei havaittu vaikutusta bakteerin lisääntymiskykyyn, vaikka taudinaiheutuskyky yleisesti ottaen olikin osittain heikentynyt. *HopAO1* sijaitsee genomien kohdassa PSPTO_4722 geeniklusterissa IX, jossa on myös virulenssille välttämätön *hopG1* sekä *hopV1* ja *hopAA1*-2 (Kvitko ym. 2009).

3.2.3 HopM1

HopM1 (aiempi nimi HopPtoM1) on löydetty aikanaan *hrp*-patogeenisuuksaarekkeiden tutkimuksen yhteydessä (Alfano ym. 2000). *HopM1* sijaitsee konservoituneessa efektorilokuksessa (CEL) yhdessä kahden muun virulenssille välttämättömän efektorigeenin, *avrE* ja *hopAA1* kanssa. Nämä kolme efektoriproteiinia näyttäisivät olevan hyvin merkityksellisiä bakteerien taudinaiheutuskyvyille, koska ne löytyvät *Pst* DC3000 -bakteerin lisäksi myös *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (pavun lehtilaikku, halo blight) ja *P. syringae* pv. *syringae* B728a (pavun ja tupakan ruskeapistetauti, brown spot) ja *P. syringae* pv. *tomato* T1 (tomaatin täplätauti, bacterial speck of tomato) -bakteereilta (Cunnac ym. 2011, Kvitko ym. 2009). HopM1 vaikuttaa kasvien vesikkeliliikenteeseen (myöhäinen PTI) sekä estää kasvin oksidatiivisen purkauksen, ROS-reaktion (reactive oxygen species, ROS) ja ilmarakojen sulkeutumisen, jotka ovat kasvin aikaisen vaiheen PTI-reaktioita (Lozano-Duran ym. 2014).

Kasvi kuljettaa solulimassa vesikkeleissä immuunipuolustukseen tuotettuja yhdisteitä, kuten PR-reseptoreja ja antimikrobisia yhdisteitä, kasvin kohde-elimeen. Kasvin vesikkeliliikennettä säätelee sekä PTI- että ETI-reaktioissa AtMIN7, joka on ADPribosylaatiofaktori-guaaniinukleotidin vaihtofaktori (ARF-GEF) -proteiini. HopM1 aktivoi AtMIN7-proteiinin hajotusta proteosomissa (kuva 2.) (Nomura ym. 2006, Nomura ym. 2011, Macho & Zipfel 2015). AtMIN7 saattaa vaikuttaa myös kalloosin kertymiseen kasvin soluseinään, sillä Δ CEL-mutantti ei pystynyt estämään kalloosin kertymistä *Arabidopsis thaliana* -kasvilla. HopM1 tai AvrE-efektoriproteiinin palautus bakteerille taas esti kalloosin kertymisen soluseinään (DebRoy ym. 2004). AtMIN7 on hyvin keskeinen vaikutuskohde, koska sitä tarvitaan sekä kasvin aikaisen vaiheen immuniteetissa (PTI), että myöhemmässä vaiheessa (ETI). Tämän takia ei liene yllättävää, että bakteerin taudinaiheutuskykyyn vaikuttaa merkittävästi *hopM1*-geenin

poisto (Badel ym. 2003, Badel ym. 2006, Kvitko ym. 2009). Lisäksi se on yksi *Pst* DC3000 -bakteerin virulenssikyvyn palautukselle välttämättömistä Hop-efektoriproteiineista (Cunnac ym. 2011).

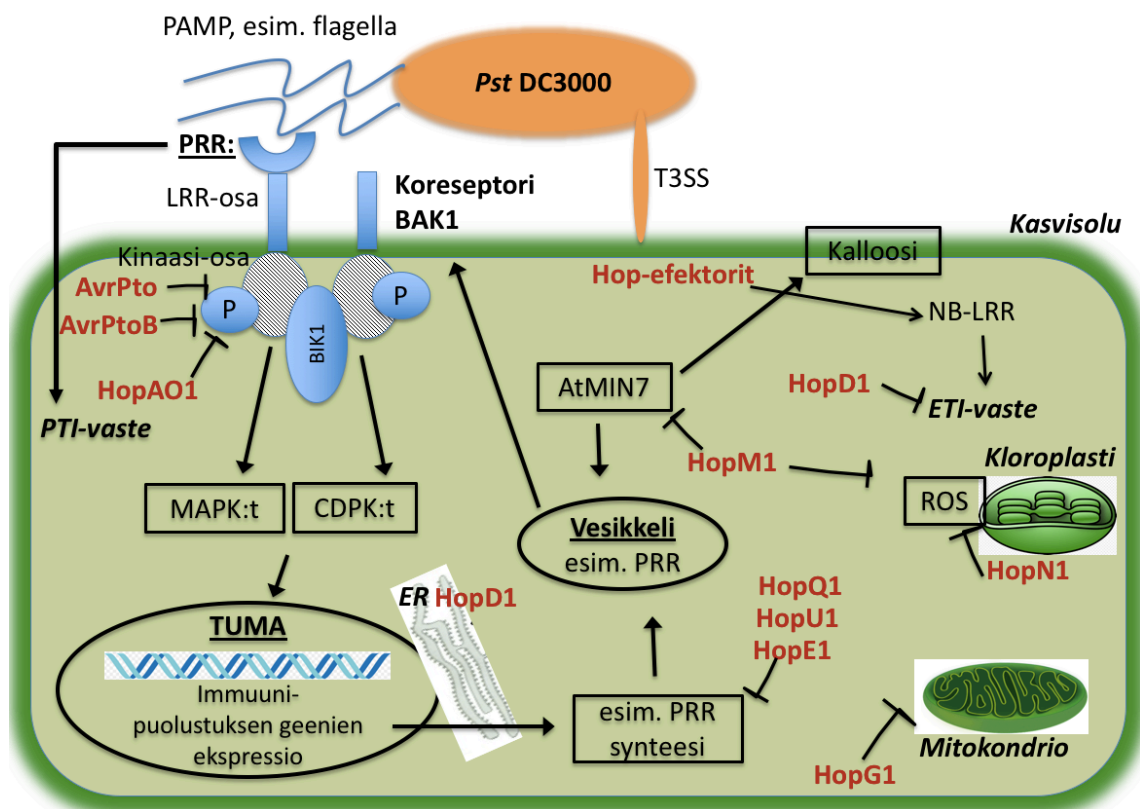
Kasvien immuunipuolustukselle hyvin keskeinen tekijä on proteiinin fosforylaatio signaalinvälityksessä. Signaalinvälitysketjun fosforyloidun proteiinin seriini tai treoniini-aminohappoon sitoutuu vielä säätelyproteiini 14-3-3. Monet efektoriproteiinit vaikuttavat näihin 14-3-3-fosforylaation säätelyproteiineihin. HopM1 vaikuttaa GRF8/AtMIN10 14-3-3 -proteiiniin, joka estää kasvin ilmarakojen sulkeutumisen (Lozano-Duran ym. 2014). Bakteri-infektion yhteydessä kasvi tarvitsee salisyylihappohormonia, jotta se pystyy sulkemaan lehtien ilmaraot ja sitä kautta bakteerien sisäänpääsyreitin kasviin. Kasvin jasmonihappo toimii vastavaikuttajana salisyylihapolle ja pitää ilmaraot avoinna. *Pst* DC3000 -bakteeri erittää koronatiinia, joka matkii jasmonihappoa ja saa näin kasvin pitämään ilmaraot avoinna bakteerien sisäänpääsyä varten. Koronatiinin lisäksi bakteeri erittää useita efektoriproteiineja, jotka vaikuttavat myös ilmarakojen aukipitoon, kuten yllä mainittu HopM1 ja HopZ1a sekä HopF1. Kasvin salisyylihapolla on myös muita tärkeitä tehtäviä kasvin immuunipuolustuksessa, minkä takia monet bakteerin efektoriproteiinit estävät suoraan salisyylihappohormonin toimintaa. Esimerkiksi HopM1-efektorin vaikutuskohde AtMIN7-proteiinia tarvitaan vesikkeliliikenteen lisäksi kasvin salisyylihappovälitteiseen immunitettiin (Asai & Shirasu 2015).

Kasvitesteissä tomaatilla HopM1-efektoriproteiinin deletio heikensi *Pst* DC3000 -bakteerin leesioiden tuottoa tomaatissa, mutta ei vaikuttanut bakteerin lisääntymiseen kasvissa (Badel ym. 2003). HopM1-efektoriproteiinilla ja sen viereisessä CEL-lokuksessa olevalla AvrE-efektorilla on todettu osittain päällekkäisiä vaikutuksia. *Pst* DC3000 $\Delta avrE1$ -mutantti pystyi kasvamaan normaalisti kasvisoluissa, mutta sen leesioiden tuotto oli heikentynyt. Kun bakteerilta poistettiin sekä *avrE* että *hopM1*-geenit, sen leesioiden tuotto ja lisääntyminen kasvisoluissa olivat molemmat heikentyneet. (Badel ym. 2006.)

3.2.4 HopD1

HopD1 (aiempi nimi HopPtoD1) sijaitsee *Pst* DC3000 -bakteerin kromosomin geenilokuksessa PSPTO_0876 efektorigeenien geeniklusterissa IV yhdessä *hopQ1-1* ja *hopR1*-efektorigeenien kanssa (Kvitko ym. 2009). Ensimmäisen kerran kyseinen Hop-efektoriproteiini on identifioitu Petnicki-Ocwieja ym. (2002) tutkimuksessa.

HopD1-efektoriproteiinin vaikutuksia ei ole vielä kovinkaan paljon tutkittu. HopD1-efektoriproteiinilla havaittiin olevan vahva vaikutus kasvin ETI-reaktion estoon, mutta ei minkäänlaista vaikutusta kasvin PTI-reaktioihin (Jamir ym. 2004, Guo ym. 2009, Block ym. 2014). PTI-reaktioon vaikuttavia efektoriproteiineja on löydetty useita, samoin efektoriproteiineja, jotka vaikuttavat sekä kasvin PTI-, että ETI-reaktioon. Sen sijaan pelkkään ETI-reaktioon vaikuttavia efektoreja *P. syringae* -bakteerilta ei juurikaan ole löydetty (Block ym. 2014). ETI-reaktion esto vaikutus havaittiin seulontatutkimuksissa jo 2004 ja 2009, jolloin HopD1 esti HopA1-indusoidun hypersensitiivisen reaktion tupakkakasvissa (Jamir ym. 2004, Guo ym. 2009). *HopD1*-mutaatiolla on havaittu olevan eri vaikutuksia eri bakteereilla, mikä johtuu efektoriproteiinien yhteisvaikutuksesta. Eri bakteereilla on yleensä erilainen Hop-efektorien kokoonpano, joka voi sisältää päällekkäisiä vaikutuksia HopD1-efektorin kanssa. Tällöin *hopD1*-mutaatiolla ei välttämättä ole merkitystä bakteerin virulenssiin. Sen sijaan *Pst* DC3000 -bakteerin kykyyn infektoida lituruohoa *hopD1*-mutaatiolla oli merkittävä vaikutus. HopD1-proteiinilla ei ole mitään tunnettua entsyymaattista aktiivisuutta. Sen sijaan sen on todettu vaikuttavan kasvin endoplasmisessa kalvostossa (ER) lituruohon NTL9-proteiiniin, joka on transkriptiofaktori. HopD1 estää NTL9-transkriptiofaktoriin indusoimien geenien ekspression kasvin ETI-reaktion yhteydessä. Estomekanismin yksityiskohtia ei edelleenkään tunneta (Block ym. 2014). Myös *Saccharomyces cerevisiae* -leivinhiivalla testattaessa HopD1 hakeutui nimenomaan endoplasmiseen kalvostoon (kuva 2.). Lisäksi HopD1 inhiboi hiivan kasvua (Munkvold ym. 2008).



KUVA 2. Hop-efektoriproteiinien vaikutukset kasvisolussa. Kasvisolun pinnalla olevat toistokuvioita tunnistavat reseptorit (PRR) tunnistavat taudinaiheuttaja mikrobien molekyylirakenteet (PAMP), joita ovat esim. flagellan Flg22-proteiinit. Tästä käynnistyy kasvilla aikaisen vaiheen puolustusreaktio, PAMP-rakenteiden laukaisema immunitetti (PTI). PR-reseptoreissa on solunulkopuolinen leusiinirikas toistojaksoja sisältävä proteiiniosa (LRR) ja solunsisäinen kinaasiosa. Kasvipatogeenin tunnistuksen jälkeen PR-reseptori muodostaa kompleksin BAK1-koreseptorin (brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1) kanssa, mistä seuraa molempien proteiinien solunsisäisen kinaasiosan fosorylaatio. Tästä käynnistyy solussa signaalinvälitysketjut joko Botrytis-indusoitujen (BIK1) tai mitogeeni-aktivoitujen (MAP) tai kalsiumiriippuvaisten (CDP) -proteiinikinaasien välityksellä, jotka aktivoivat kasvisolun tumassa immuunipuolustuksen geenien ekspression, esim. uusien PR-reseptoriproteiinien valmistuksen. Kasvin immuunipuolustuksen välineet, esim. PR-reseptorit kuljetetaan vesikkeleissä oikeaan paikkaan kasvisolussa. *Pst* DC3000 -bakteerin T3SS-mekanismiin kautta eritetyt Hop-efektoriproteiinit (kuvassa punaisella) estävät eri osia kasvin immuunipuolustuksessa. HopAO1 on tyrosiini-fosfataasi, joka poistaa PR-reseptorin aktivointiin tarvittavat kinaasiosan fosfaatit, jolloin PTI-reaktion aktivointiin tarvittava signaalinvälitys katkeaa. AvrPto ja AvrPtoB estävät mm. PR-reseptorien aktivointiin tarvittavien kinaasien toimintaa. HopD1 hakeutuu kasvilla endoplasmiseen kalvostoon (ER) ja estää kasvin toisen vaiheen puolustusreaktiota, efektoriproteiinien laukaisemaa immunitettia (ETI). Kasvin ETI-reaktio käynnistyy, kun sen solunsisäiset NB-LR-reseptorit tunnistavat bakteerin efektoriproteiinin. HopM1 estää kasvin AtMIN7-proteiinin toimintaa, jota tarvitaan kasvin vesikkeliliikenteessä ja kalloosin kertymisessä soluseinään. Lisäksi HopM1 estää kasvin kloroplasteissa oksidatiivisen purkauksen (ROS) yhdessä HopN1-efektorin kanssa. HopG1-efektori vaikuttaa mitokondrioiden toimintaan. HopE1, HopU1 ja HopQ1 vaikuttavat eri mekanismeilla PR-reseptorien valmistukseen. HopM1, HopE1, HopN1, HopG1 ja AvrPtoB kuuluivat *Pst* DC3000 -bakteerin virulenssin palautukselle välttämättömiin efektoreihin (Cunnac ym. 2011). (Kuvan mallina käytetty Dodds & Rathjen 2010, Xin & He 2013.)

4 MuA-TRANSPOSITIOKOMPLEKSI ELI TRANSPOSOSOMI

Transposonit ovat liikkuvia DNA-sekvenssejä, joita kutsutaan myös ”hyppiviksi geeneiksi” tai siirtyviksi osiksi, koska ne siirtyvät joko genomien sisällä tai eri genomien välillä eri paikkoihin. Transposoneja löytyy luonnostaan genomeista aiheuttaen materiaalia esim. evoluutioon. Transposoni katalysoi oman siirtymisensä uuteen DNA-sekvenssiin, jota kutsutaan transpositioksi. Tämän takia transposoneja on helppo muokata ja hyödyntää mm. geeninsiirtoon ja genomien muokkaukseen (Biemont & Vieira 2006).

Bakteriofagi Mu käyttää luontaisessa elinkierrossaan transpositiota. Lysogeeninen faagi Mu (mutator phage) koostuu käytännössä transposonista, joka on viruksen kuoren (coat) sisällä ja tämä transposoni integroituu ja replikoituu transpositiolla. Se on DNA-transposoni, jonka lysogeenisen syklin transpositioreaktio muistuttaa perinteistä ”leikkaa-liimaa” transpositiomallia. Transposoni irrotetaan donorista ja liitetään transposaasin katalysoimana uuteen paikkaan. Faagi integroituu kromosomiin lähes sattumanvaraisesti ja aiheuttaa sattumanvaraisia insertiomutaatioita kromosomin geeneihin (Harshey 2014). Mu-faagin luonnollinen lysogeenisen syklin transpositioreaktio on kolmevaiheinen. Ensin MuA-transposaasi-entsyymi sitoutuu transposonin toistojaksoihin ja muodostuu tetrameerinen transpososomiksi kutsuttu rakenne, jossa on neljä MuA-proteiinia kiinni. MuA-entsyymi tarvitsee transpososomirakenteen muodostamiseen kofaktoriksi Ca^{2+} -ioneita. Seuraavassa vaiheessa MuA-transposaasi katalysoi transposonin irrotuksen donori-DNA:n 3'-päistä. Tähän reaktioon MuA-entsyymi tarvitsee kofaktoriksi Mg^{2+} -ioneita. Viimeisessä vaiheessa DNA:ta sitova MuB-proteiini aktivoi transposonin DNA-juosteen siirron kohde-DNA:han (Harshey 2014, Savilahti ym. 1995).

Yksinkertaistetussa reaktiossa MuA-transpososomi sisältää koeputkessa eli *in vitro* koottuna ainoastaan MuA-transposaasi-entsyymien (tetrameerina) sekä halutun DNA-substraatin eli transposonin. MuA-transpositiokompleksien transpositio aktivoituu vasta, kun ne kohtaavat MuA-transposaasin kofaktorina toimivia Mg^{2+} -ioneita. *In vitro* kootut kompleksit voidaan viedä esimerkiksi elektroporaatiolla bakteerisoluihin, jossa MuA-transposaasi käynnistää transposonin transposition sattumanvaraiseen kohtaan bakteerin kromosomiin (kuva 3.) (Lamberg ym. 2002). Transposonilta vaaditaan tietyt ominaisuudet, jotta kyseinen transpososomi toimii ilman sen luontaisessa transpositiossa vaadittavia kofaktoreita. Savilahti ym. (1995) määrittivät transposonille tarvittavat

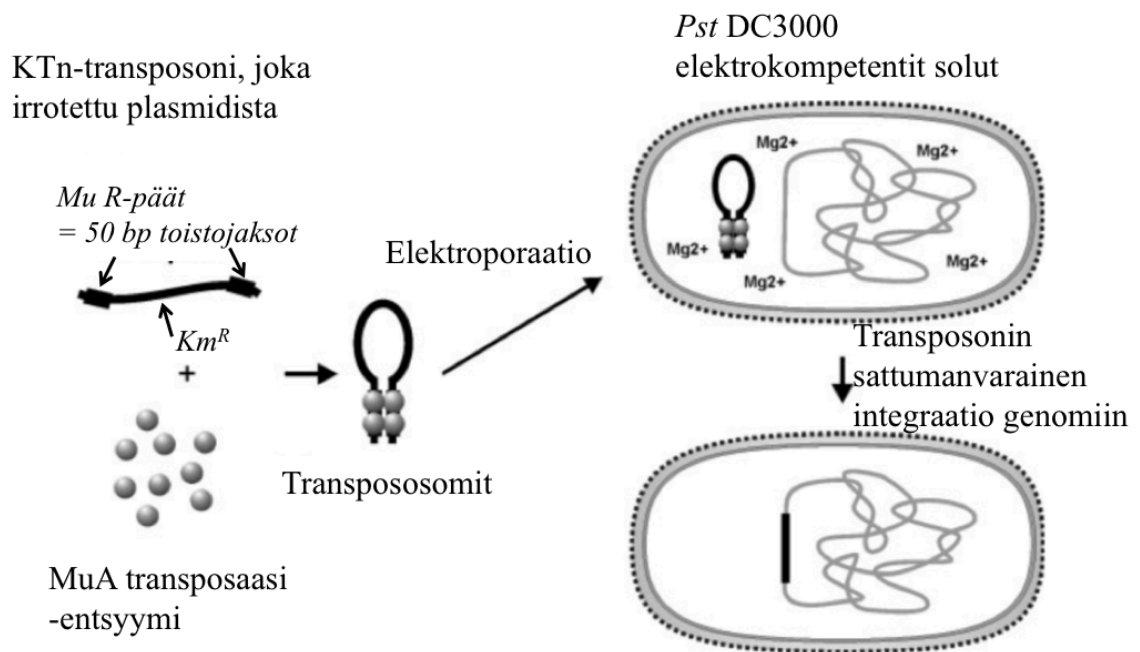
”minimiominaisuudet”, jotta *in vitro* transpososomi toimii optimaalisesti elävässä eliössä eli *in vivo*. Suurin osa kofaktorivaatimuksista poistui, kun transposoni leikattiin valmiiksi irti donorista. Reaktiopuskuriin lisätty DMSO edisti myös transpositiota. Lisäksi *in vitro* valmiiksi leikatussa transposonissa sen siirto kohde-DNA:han toimii tehokkaimmin, kun molemmat toistojaksopäät ovat oikeanpuoleisia. Luonnollisessa siirrossa se toimii parhaiten, kun toinen on vasemman ja toinen oikeanpuoleinen (Savilahti ym. 1995).

Mutageneesiin käytettävän transposonin tulisi sisältää markkerigeeni, kuten antibioottiresistenssigeeni. Transposoni ei saisi olla kovin valikoiva kohdesekvenssin suhteen, sillä pitäisi olla mahdollisimman laaja kohdeisäntä valikoima (eri bakteerilajeja) sekä sen pitäisi liikkua suhteellisen korkealla frekvenssillä. Faagi Mu:lla on korkein transpositiofrekvenssi ja matalin kohdesekvenssispesifisyys verrattuna kaikkiin muihin liikkuviin DNA-jaksoihin (transposable elements) (Haapa ym. 1999a, Haapa-Paananen ym. 2002, Harshey 2014). MuA-transposaasi valitsee ainoastaan 5 bp:n pituisen kohdesekvenssin. Tähän transposonin integraatiokohtaan muodostuu Mu-transposonille tunnusomainen 5 bp:n kohdesekvenssin kahdentuminen (Haapa-Paananen ym. 2002, Lamberg ym. 2002). Kompleksin transposition tehokkuus on osoitettu useissa tutkimuksissa, mm. elektroporaatiolla on saavutettu hyvä transformaatiotehokkuus, mikä mahdollistaa mm. suurien mutanttikirjastojen luomisen esim. virulenssigeenien selvitystä varten (Haapa ym. 1999a, Lamberg ym. 2002, Pajunen ym. 2005).

Transpositiomenetelmiä on käytetty perinteisesti *in vivo*, esim. konjugaatiolla. *In vivo* -reaktioissa rajoittavina tekijöinä ovat esim. sopivat isäntäbakteerit (Goryshin ym. 2000, Haapa ym. 1999a). *In vitro* -menetelmissä, kuten MuA-transpositiokompleksilla, isännällä ei ole väliä. MuA-transpositiokompleksin menetelmää on käytetty sekä gram-positiivisilla (Pajunen ym. 2005) että gram-negatiivisilla bakteereilla (Lamberg ym. 2002) ja lisäksi hiivalla ja nisäkässoluissakin (Paatero ym. 2008). Tn5-transposonilla on tehty samantyyppinen *in vitro* -kompleksi (Goryshin ym. 2000) kuin Lamberg ym. (2002) julkaisussa kuvattu MuA-transpositiokompleksi. Menetelmän etuna on myös, että Mu-transposoni tekee vain yhden insertion, monet muut transposonit voivat olla aktiivisia vielä kohdeisännässäänkin ja tehdä uusia transpositioita (Lanckriet ym. 2009). Jos isäntään viedään aktiivinen MuA-transposaasi, on transposonin uudelleen aktivoituminen mahdollista (Lamberg ym. 2002). Joissain isännissä voi olla vaarana, että isäntäsolun proteaasit pilkkovat transpososomin ennen integraatiota, mutta todennäköisesti Mu-

kompleksin transpositio aktivoituu niin nopeasti etteivät proteeasit ehdi vielä löytää sitä (Lamberg ym. 2002).

Bakteriofagi Mu:n *in vitro* transpositioon perustuvaa menetelmää on käytetty laajasti geeniteknologian työkaluna. Transposoni-insertiokirjaston kautta voi tehokkaasti tutkia bakteerigenomin geenien toimintaa ja vaikutuksia bakteerin fenotyyppiin. Kirjaston tulisi olla tarpeeksi suuri, jotta se sisältäisi transposoni-insertion kaikissa bakteerin geneeissä (Pajunen ym. 2005). Sitä on käytetty myös DNA:n sekvensoinnissa (Haapa 1999b) sekä proteiinien muokkauksessa ja toiminnan tutkimuksissa (Poussu ym. 2005). Transposoneihin perustuvia menetelmiä kehitetään myös geeniterapian ja kantasolututkimuksen käyttöön (VandenDriessche ym. 2009).



KUVA 3. *In vitro* valmistetun MuA-transpososomin liittyminen kohdesolun genomiin *in vivo*. Tässä työssä käytettiin yllä näkyvää lineaarista mini-Mu-transposonia (=substraatti, =donori), joka sisälsi kanamysiiniresistenssin (Km^R) geenin ja sen molemmissa päissä oli 50 bp:n Mu R-pään (R=oikeapuoli) käänteiset toistojaksot. Transposoni irrotettiin pKAH2-kantajaplasmidistaan BglII-restriktioentsyymillä, jolloin DNA:n 3'-pääts olivat vapaana transpositioreaktiota varten. *In vitro* valmistettu MuA-transpososomi koostui KTn-transposonista, jonka molempiin päihin oli sitoutunut neljä MuA-transposaasin proteiinia (=entsyymi). Transpososomi oli inaktiivinen, kunnes elektroporaatioissa Mg²⁺-ionit aktivoivat sen transposaasi-entsyymin tekemään transpositioreaktion kohdesolun genomiin. (Kuva muokattu Pajunen ym. 2005 julkaisusta.)

5 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT

Pro gradu -tutkielmani on osa tutkimusta, jonka tarkoituksena on selvittää gram-negatiivisten kasvipatogeenisten bakteerien virulenssimekanismeja sekä patogeneesiin liittyvää geenien säätelyä ja vaikutuksia kasvien ja bakteerien välisissä suhteissa.

Tämän työn tavoitteena on selvittää kasvipatogeenin *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 -bakteerin tyypin III eritysmekanismin (T3SS) Hop-efektoriproteiinien merkitystä taudin synnylle.

Työssä selvitetään faagi MuA-transpositiokompleksin soveltuvuutta gram-negatiivisen kasvipatogeenisen bakteerin transposoni-insertiokirjaston valmistukseen. Työssä on tarkoitus kehittää ja optimoida mutanttikirjaston seulontaan soveltuva menetelmä eri *hop*-geeneissä olevien transposoni-insertioiden löytämiseksi. Kirjaston seulonnasta löydetty *hop*-geenimutantit bakteerit eristetään ja testataan kyseisen *hop*-efektorigeenin mutaation vaikutuksia bakteerin taudinaiheutuskykyyn *Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker -kasveilla.

6 AINEISTO JA MENETELMÄT

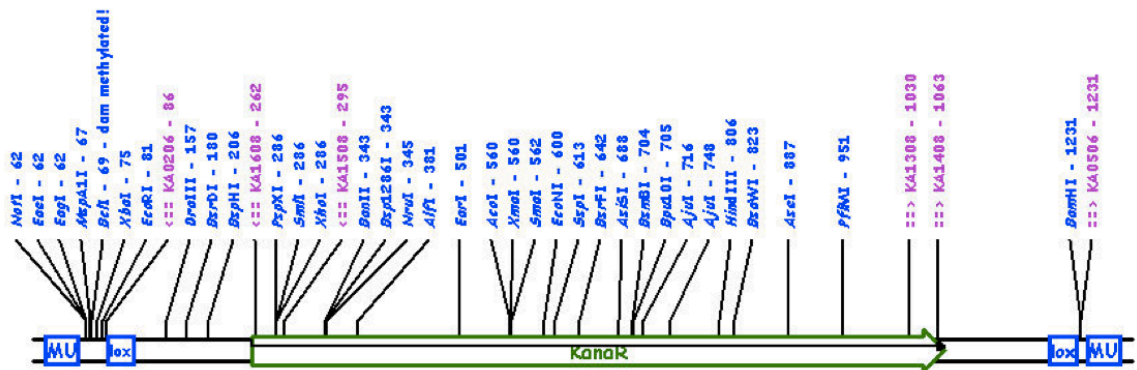
Tutkimuksen käytännön osuus toteutettiin Helsingin yliopiston, Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen perinnöllisyystieteen laboratoriossa 28.2.2008-20.6.2009 välisenä aikana. Työn ohjaajana toimi dosentti Hannu Saarilahti. Biotekniikan instituutissa Solubiotekniikan tutkimusohjelman laboratoriossa MuA-transpositiokompleksin valmistuksen ohjasi dosentti Maria Pajunen.

6.1 Käytetyt bakteerikannat ja kasvatusolosuhteet

Työssä käytettiin villityypistä *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 -bakteerikantaa ja sen mutanttikantoja. Avirulentti *Pst* DC3000 *hrpA* -mutanttibakteerikanta saatiin Suvi Tairalta. *Pseudomonas*-bakteerien kasvatukset tehtiin King's B -alustalla (KB) (King ym. 1954) aerobisissa olosuhteissa +28°C:ssa ellei toisin ole mainittu. *Escherichia coli* DH5α/pKAH2 kasvatukset tehtiin Luria-alustalla aerobisissa olosuhteissa +37°C:ssa ellei toisin ole mainittu (Sambrook & Russell 2001). Tarpeen mukaan *E. coli* ja *P. syringae* -bakteerien kasvatuksissa plasmidin tai transposoni-insertioiden ylläpitämisessä käytettiin seuraavia antibiootikonsentraatioita: 30, 25 µg ja 12,5 µg/ml kanamysiiniä (Km) ja ampicilliinia 100 µg/ml. Bakteerikannat säilytettiin glyserolistokkeina (bakteerin kasvatusalusta suspensiona, jossa oli 1:5 kokonaistilavuudesta 50 % glyserolia) -80°C:ssa.

6.2 Plasmidit

Plasmidi pKAH2 kooltaan 2958 bp sisältää KTn-transposonin kooltaan 1281 bp (kuva 4.). Plasmidikonstrukti saatiin Kukka Aholta. Transposonissa on kanamysiiniantibiootin resistenssigeeni ja 50 emäsparin Mu-toistojaksot sekä *Bgl*II-restriktioentsyymien tunnistuskohdat transposonin molemmissa päissä. Kanamysiinigeenin molemmissa päissä on vielä lox-tunnistuskohdat, joita voidaan hyödyntää jatkossa antibioottiresistenssigeenin poistossa Cre-lox-mekanismilla. Cre-lox-mekanismi on paikkaspesifinen rekombinaatiomenetelmä (site-specific recombination), jolla voidaan lox-tunnistuskohdienten avulla tehdä esim. deleetioita tai insertioita tiettyyn kohtaan DNA:ta. Kohdebakteeriin viedään Cre-plasmidi, joka sisältää bakteriofagi P1:stä peräisin olevan Cre-rekombinaasin, joka katalysoi lox-tunnistuskohdienten rekombinaation



30

6.3 DNA-menetelmät ja reagenssit

E. coli -bakteerin DH5 α -kannasta eristettiin pKAH2-plasmidi-DNA Qiagenin Plasmid Maxi -kitillä valmistajan ohjeiden mukaisesti. Transposonin irrotukseen käytettiin restriktioentsyymejä (New England Biolabs) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Agarosigeelijaissa käytettiin Seakemin NuSieve -agarosia, 1 x TAE-puskuria (tris-asetatti-EDTA-puskuri) ja geelien värjäykseen etidiumbromidia 5 μ g/ml. Näytteisiin lisättiin 1 x DNA Loading Dye -reagenssia (Thermo Scientific) ja molekyylipainomarkkerina käytettiin GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas) tai GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) (ellei toisin ole geelikuvassa mainittu). MuA-transpositiokompleksin valmistuksessa käytetty MuA-transposaasi oli Finnzymesilta. *Pst* DC3000 -bakteerin mutanttikirjaston yläpooleista eristettiin PCR:ää varten kromosomaalinen DNA Sigma Aldrichin -kitillä (GenElute Bacterial Genomic DNA) valmistajan ohjeiden mukaisesti. PCR-tuotteiden DNA-sekvenssien määitykset tilattiin ostopalveluna Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutin sekvensointilaboratoriosta (www.biocenter.helsinki, Petri Auvinen), jossa käytettiin Applied Biosystems (ABI) 3130 ja 3730 -sekvensointilaitteita. Sekvensoinnissa käytettiin joko KA1608 tai KA1408-alukkeita (taulukko 2.). Sekvensointia varten PCR-tuotteista ajettiin preparatiivinen agarosigeeli, josta geelipalat puhdistettiin Qiagenin QIAEXII geelieristys -kitillä valmistajan ohjeiden mukaisesti (QIAEXII DNA Extraction from Agarose Gels -työohje).

Pst DC3000 -bakteerin koko genomi on sekvensoitu (Buell ym. 2003) TIGR, The Institute for Genomics Research toimesta (NC_004578), mitä hyödynnettiin tässä työssä *hop*-geenien alukkeiden suunnittelussa ja sekvensointituloksien tulkinnassa (liite 3. ja 4.).

6.4 MuA-transpositiokompleksin valmistus

MuA-transpositiokompleksin valmistus sekä sen elektroporaatio kompetentteihin soluihin on kuvattu ensimmäisen kerran Lamberg ym. (2002) artikkelissa.

6.4.1 Transposonin eristys, puhdistus ja konsentroidi

Transpososomin eli transpositiokompleksin valmistukseen tarvitaan noin 1000 μ g plasmidi-DNA:ta, jonka konsentraatio on noin 1 μ g/ μ l. Qiagenin Plasmid Maxi -kitillä

eristettiin *E. coli* DH5 α /pKAH2 -bakteerikannasta 2360 μ g plasmidi-DNA:ta, jonka pitoisuus oli 1,18 μ g/ μ l. Plasmidi-DNA digestoitii *Bgl*II-restriktioentsyymillä, jotta saatiin transposoni irti plasmidista. Irrotettua KTn-transposonia puhdistettiin fenoli-kloroformiuutoilla ja lopuksi saostettiin natriumasetaatilla ja etanolilla. Transposoni-DNA:n konsentraatio tässä vaiheessa oli 1,32 μ g/ μ l ja kokonaissaanto 792 μ g. Transposonia puhdistettiin lisää SMART-system (Pharmacia) HPLC-nestekromatografiamenetelmällä (High Performance Liquid Chromatography) käyttäen Tosohaas-pylvästä. HPLC:llä kerätyt transposoni-DNA-fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin alkoholisaostuksella liite 2. Happonen 2006 -ohjeen mukaisesti. Transposoni-DNA:n konsentraatio tässä vaiheessa oli 692 ng/ μ l ja kokonaissaanto 218 μ g.

6.4.2 Transpositiokompleksin kokoaminen

Transpososomin kokoaminen tehtiin liite 2. Happonen 2006 -ohjeen mukaisesti. *In vitro* 80 μ l:n kokonaistilavuuden transpososomi-reaktio sisälsi 4,4 pmol (= n. 4,0 μ g) transposoni-DNA:ta (donori), 1,6 μ g MuA-proteiinia sekä 50%-glyserolia (v/v, lopputilavuudessa) ja MuA-laimennospuskuria (1 x lopputilavuudessa, kuten Pajunen ym. 2005 julkaisussa on kuvattu). Reaktio tapahtui +30°C vesihauteessa 3,5 tuntia. Transpositiokompleksin kokoamisen onnistuminen varmistettiin agarosigeelillä (kuva 5.).

6.4.3 Transpositiokompleksien konsentrointi

Transpositiokompleksit konsentroitiin ja näytteestä poistettiin suolot elektroporaatiota varten. Transpositiokompleksin kokoamisvaiheesta ja konsentroidin eri vaiheista otettiin agarosigeeliajoa varten näytteet, jotta varmistuttiin sen laadusta (kuva 5.). Transpositiokompleksin kahdeksan kokoamisreaktiota (kokonaistilavuus 80 μ l) kerättiin yhteen, jolloin kokonaistilavuudeksi saatiin 640 μ l. Seokselle tehtiin polyetyleeniglykoli (PEG) -saostus jäällä 65 minuuttia ja sen jälkeen sentrifugointi 66 minuuttia. Lopuksi pelletti liuotettiin 50 μ l:aan 10 mM Tris-HCl pH 6,0; 0,5%-glyseroli ja 0,1 mM DTT (ditiotreitoli) jäällä yli yön. Liite 2. Happonen 2006 -ohjeen mukaisesti.

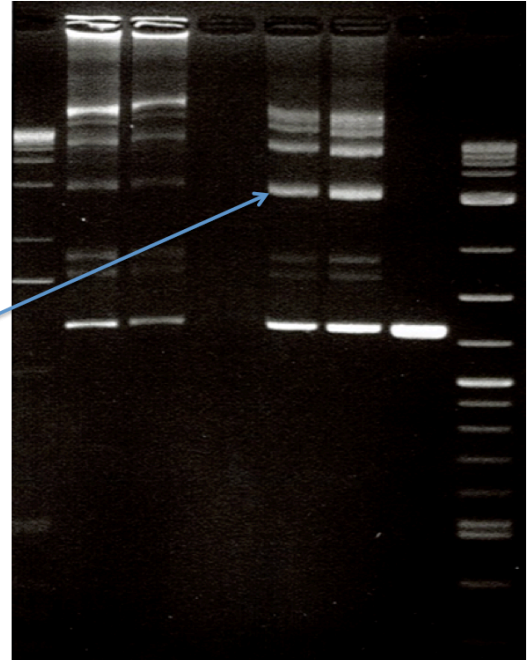
Valmis transpositiokompleksi jäädytettiin ensin nestetyössä ja siirrettiin -70°C säilytykseen. Transpositiokompleksin sulatus käyttöä varten tulee tehdä jäällä. Transpositiokompleksin pitoisuudeksi arvioitiin agarosigeelikuvasta $585\text{ ng}/\mu\text{l}$ (kuva 5.).

Transpositiokompleksin tarkistus ja konsentraation arviointi agarosigeelillä

Näytekaivot:

1-3: Kompleksin konsentrointi

- 1: Kokoamisvaihe
- 2: Saostusvaihe
- 3: PEG-supernatantti
- 4: Konsentroidu valmis kompleksi $0.5\text{ }\mu\text{L}$
- 5: Konsentroidu valmis kompleksi $1\text{ }\mu\text{L}$
- 6: transposoni 1.3 kb
- Invitrogen 1 kb DNA Ladder $5\text{ }\mu\text{L}$
- Geelikuvasta arvioitu kompleksin pitoisuus $c=585\text{ ng}/\mu\text{l}$



KUVA 5. Transpositiokompleksin laadun arviointi eri työvaiheiden kautta sekä pitoisuuden arviointi agarosigeelillä. Kuvassa sinisellä nuolella osoitettu transpositiokompleksin vyöhyke. Kuvassa kontrollina pelkkä transposoni (6), jota jonkin verran löytyy kaikista työvaiheista (paitsi PEG-supernatantista). Transposoni, johon on onnistuneesti liittynyt MuA-proteiini, on kooltaan isompi, kuin pelkkä transposoni. PEG-supernatantissa (3) ei kuulu näkyä lainkaan DNA:ta, koska tarkoituksena oli saostuksella konsentroida kompleksi ja heittää supernatantti pois. Näin varmistettiin, että saostus on onnistunut eikä transpositiokompleksia ole jäänyt liuokseen. Kuvassa nähdään myös, että transpositiokompleksin pitoisuus on kasvanut konsentroinnin myötä.

6.5 Mutanttikirjaston valmistus

Villityyppisen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 -bakteerin koko genomi mutatoitiin KTn (Kukkatransposoni) -transpositiokompleksilla. *Pst* DC3000 -bakteerikannasta valmistettiin kompetentteja soluja, joihin siirrettiin elektroporaatiolla KTn-kompleksia.

6.5.1 Elektrokompetenttien solujen valmistus ja elektroporaatio

Yli yön kasvaneesta *Pst* DC3000 -bakteerin 5 ml liuoskasvatuksesta tehtiin 1:25 laimennos 100 ml tilavuuteen KB-elatusainetta ja kasvatusta jatkettiin +28°C:ssa 220 rpm sekoituksessa noin 4 tuntia, jolloin OD₆₀₀ oli n. 0,4-0,5. Solut kerättiin sentrifugoimalla 4000 rpm 15 min. +4°C:ssa (Heraeus sentrifugi). Soluja pestiin sen jälkeen yhteensä 4 kertaa resuspensoimalla solut ensin jäällä 1,5 ml:aan jääkylmää steriiliä vettä ja taas keräämällä solut sentrifugoimalla 6000 rpm 5 min. +4°C:ssa. Lopuksi solut suspensoitiin 40-100 µl:aan jääkylmää steriiliä vettä riippuen solumäärästä. Solut käytettiin tuoreena heti valmistuksen jälkeen elektroporaatioon. *Pst* DC3000 -bakteerin elektrokompetentit solut eivät säily pakastettuna. (Työohje Biorad-laitevalmistajan elektrokompetenttien solujen valmistusohjeita mukaellen.)

Elektroporaatiota varten otettiin tuoreita juuri valmistettuja *Pst* DC3000 -kompetentteja soluja 40 µl, joihin sekoitettiin jäällä 0,3 µl (= n. 175 ng, c=585 ng/µl) transpositiokompleksia. Seos siirrettiin esijäähdytettyyn 0,2 cm elektroporaatiokyvetiin (Biorad). Elektroporaatio tehtiin Gene Pulser II (Biorad) -laitteella 5 ms pulssilla ja kentän voimakkuudella 12,5 kV/cm. Sen jälkeen elektroporaatiokyvetiin lisättiin esilämmitettyä KB-elatusainetta 960 µl ja seosta inkuboitiin +28°C:ssa 250 rpm 1 h. Transposoni-insertioiden valikointia varten kasvatukset levitettiin KB (12,5 Km) -agarmaljoille sopivina laimennoksina (100 µl 1:20 laimennettua kasvatusta eli kokonaislaimennos 1:200). KTn-transpositiokompleksin transformaatiotehokkuus *Pst* DC3000 -soluihin (DC3000/KTn kompleksi) oli $1-2 \times 10^5$ CFU/µg DNA:ta. Transformaatioissa käytettyjen *Pst* DC3000 -kompetenttien solujen vitaalikapasiteetti (V.C.) oli 4×10^8 - 1×10^9 CFU/ml).

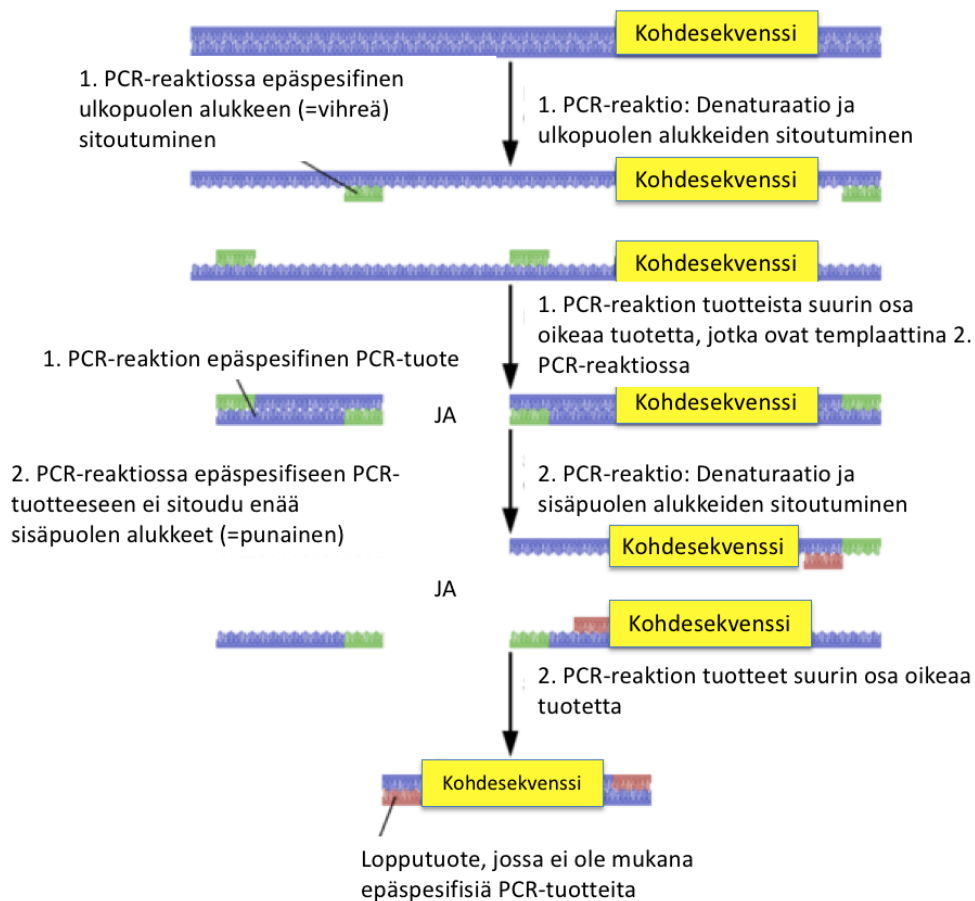
6.5.2 Transposoni-insertiokirjaston valmistus

Pst DC3000 -bakteerin transposoni-insertiokirjasto valmistettiin yhdistämällä kolmen transformaatiomaljan pesäkkeet (n. 40 pesäkettä/malja) n. 120 pesäkkeen alapooleiksi. Pesäkkeet kerättiin maljoilta 0,9 % NaCl:in ja säilytettiin -80°C pakkasessa glyserolistokkeina. Alapooleja valmistettiin kaikkiaan 124 kappaletta (KTn1-124), jolloin koko kirjasto sisälsi n. 14 500 pesäkettä. Laskennallisesti tämän pesäkemäärän pitäisi kattaa koko *Pst* DC3000 -bakteerin genomi, joka on kooltaan 639712 bp (n. 6,4 Mbp). Kirjaston seulonnan helpottamiseksi ennen glyserolin lisäystä viisi alapoolia (120

pesäkettä/alapooli) yhdistettiin yhdeksi yläpooliksi, joka sisälsi siis n. 600 pesäkettä. Yläpoolit nimettiin KTnA1-A24. Kirjaston pesäkepoolit säilytettiin -80°C pakkasessa glyserolistokkeina.

6.6 Sisäkkäiset alukkeet kirjaston seulonnassa

Kirjaston seulontamenetelmäksi tarkoitetun PCR-reaktion optimoinnissa oli ongelmia mm. PCR-tuotteiden spesifisyydessä. Lopulta löydettiin toimiva seulontamenetelmä nested-PCR-menetelmästä. Menetelmässä tehtiin ensimmäinen PCR-reaktio ns. ulkopuolen alukkeilla, jotka sitoutuivat n. 30-300 emäsparia kohdegeenin ulkopuolelle. Toinen PCR-reaktio tehtiin käyttämällä templaattina ensimmäisen PCR-reaktion tuotetta ja ns. sisäpuolen alukkeita, jotka sitoutuivat kohdegeenin alueelle (kuva 6.).



KUVA 6. Kaavakuva nested-PCR-reaktion etenemisestä ja sen merkityksestä PCR-tuotteen spesifisyyden parantamisessa.

PCR-olosuhteiden optimoinnissa käytettiin hyväksi Thermofisher Scientificin TrueStart Taq DNA -polymeraasin PCR-ohjelma -ohjeita (Harvey, David 2000. Modern analytical chemistry. Mc Graw Hill. Sivu 315.) PCR-reaktioseos 25 µl:n kokonaistilavuudessa sisälsi 1 x TrueStart Taq -puskurin, 1,5 mM MgCl₂, dNTPmix 10 mM, 1,5 U TrueStart

Taq DNA -polymeraasia, 1 M betaiinia (Sigma-Aldrich) ja 1 μ M alukkeita (taulukko 1.). PCR-ohjelmissa alukkeiden sitoutumislämpötila vaihteli PCR-reaktiossa käytettyjen alukkeiden sulamislämpötilan mukaan (taulukko 1. ja 2.). PCR-ohjelmien ekstensioaika vaihteli tuotteen koon mukaan. *HopAO1*, *hopD1* ja *hopM1*-mutanttien seulonnassa käytetyt olosuhteet on kerrottu taulukossa 3.

TAULUKKO 1. Kirjaston seulonnassa käytetyt PCR-olosuhteet sekä reaktioseokset. PCR-ohjelmissa ekstensioaika ja alukkeiden sitoutumislämpötila vaihtelee. Reaktioseoksissa ensimmäisen PCR-reaktion ulkopuolen alukkeina käytettiin H8425-6 (Rev=alavirta) ja Hop-*geeni* out-Fwd alukeparia tai H8425-5 (Fwd=ylävirta) ja Hop-*geeni* out-Rev alukeparia. Toisen PCR:n sisäpuolen alukkeina käytettiin MuEnd Primer (Finnzymes) (tai KA1408/KA1608) ja Hop-*geeni*-Fwd tai Hop-*geeni*-Rev alukepareja.

PCR MIX (ulkopuolen alukkeet)	x 1
Truestart Taq -puskuri (10x)	2,5
MgCl ₂ (25mM)	1,5
dNTPmix (10 mM)	0,5
H8425-6 (Rev) (10 pmol/ μ l)	2,5
Hop (<i>geeni</i>) out-Fwd (10 pmol/ μ l)	2,5
Betaiini (5x/5 M)	5
TrueStart Taq (5U/ μ l)	0,3
MQ	9,2
Templaatti (gDNA 100ng/solut)	1
	25

PCR-OHJELMA (ulkopuolen alukkeet):

+95°C 1 min 30 s
 +95°C 30 s
 +55°C 30 s
 +68°C 2 min
 +68°C 7 min
 - kohdat 2-4 35 sykliä
 (= 1. PCR)

PCR MIX (sisäpuolen alukkeet)	x 1
Truestart Taq -puskuri (10x)	2,5
MgCl ₂ (25mM)	1,5
dNTPmix (10 mM)	0,5
MuEnd Primer (Finnzymes) (10 pmol/ μ l)	2,5
Hop (<i>geeni</i>) -Fwd (10 pmol/ μ l)	2,5
Betaiini (5x)	5
TrueStart Taq (5U/ μ l)	0,3
MQ	9,2
Templaatti (External round PCR-tuote)	1
	25

PCR-OHJELMA (sisäpuolen alukkeet):

+95°C 1 min 30 s
 +95°C 30 s
 +56°C 30 s
 +68°C 1 min 30 s
 +68°C 5 min
 - kohdat 2-4 25 sykliä
 (= 2. PCR)

Hop-geeneille suunniteltiin alukkeet. MuEnd Primer oli Finnzymesilta ja transposonin kanamysiinialukkeet Kukka Aholta (taulukko 2.). Alukkeiden sulamislämpötilat (T_m, melting temperature) laskettiin Thermofisherin laskurilla (Finnzymes T_m Calculator: https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html).

TAULUKKO 2. Tutkielmassa käytetyt alukkeet ja niiden sekvenssit. Suurimmassa osassa tutkielman PCR-reaktioissa oli käytössä betaiini. Betaiinin kanssa käytetty alukkeiden sitoutumislämpötila oli yleensä 8 astetta alukkeen sulamislämpötilaa matalampi.

GEENI /SITOUTUMISKOHTA	ALUKKEEN NIMI	MONISTETTAVA ALUE	ALUKSEKVENSSI	T _m °C
	HopD1-Fwd	HopD1 geeni /Nested 2. PCR sisäpuolen aluke	5'- ATGAATCCTCTACGATCTATTCAACACAACA -3'	68,7°C
HopD1	HopD1-Rev	HopD1 geeni	5'- ACAGCCAGGTCTTGATACGGAATACG -3'	70,5°C
PSPTO_0876 2117 bp	HopD1 out-Fwd	Nested 1. PCR ulkopuolen aluke	5'- TCACATTAGTTGCGAGCGAG-3'	64,5°C
	HopAO1-Fwd (EcoRV)	HopAO1 geeni (+EcoRV sekvenssi) /Nested 2. PCR sisäpuolen aluke	5'-ACAGATATC ATGAATCCCCTGCAACCTATTCA-3'	67,5°C
HopAO1	HopAO1-Rev	HopAO1 geeni (+EcoRV sekvenssi)	5'-TGTGATATC TTCTAACGCTATTTTGGCGG-3'	66,1°C
PSPTO_4722 1407 bp	HopAO1out-Fwd	Nested 1. PCR ulkopuolen aluke	5'-CTCAACCGAGATAGTTCATACA-3'	58,9°C
	HopM1-Fwd	HopM1 geeni (+RE site)	5'-GGATACC ATGGTCAGTTCGCGGATCGGCGG-3'	79,9°C
HopM1	HopM1-Rev	HopM1 geeni (+RE site)	5'- CGGTACCATGGT ACGCGGGTCAAGCAAGCCCT -3'	74,3°C
PSPTO_1375 2138 bp	HopM1 Nested out-Rev	Nested ulkopuolen aluke (1.PCR)	5'-AGCAAGCCCTCTTCAAGTGC-3'	66,2°C
	HopM1 in-Rev	Nested sisäpuolen aluke (2.PCR)	5'- CGACTCGTGGGATACCGCTC -3'	69,4°C
KTn transposonin kanamysiini- resistenssin geeni	H8425-5 Fwd	Km geeni /Nested 1. PCR ulkopuolen aluke	5'-GGGTGTTATGAGCCATATTCAAC-3'	63,4°C
	H8425-6 Rev	Km geeni /Nested 1. PCR ulkopuolen aluke	5'-CTGATTAGAAAACTCATCGAGCA-3'	63,7°C
KTn transposonin Mu-alueen sekvenssi	Mu end primer	Mu alueen sekvenssi /Nested 2. PCR sisäpuolen aluke	5'-GTTTTTCGTGCGCCGCTTCA-3'	63,4°C
Sitoutuu KTn transposonin kanamysiinin sekvenssiin (alkupää) kohtaan 262	KA 1608	lukee ulos kohti Mu-sekvenssiä /sekvensointi aluke	5'-CAAGACGTTTCCCGTTGAATATGG-3'	69,0°C
Sitoutuu KTn transposonin kanamysiinin sekvenssiin (loppupää) kohtaan 1063	KA 1408	/sekvensointi aluke	5'-GCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAG-3'	69,8°C

TAULUKKO 3. Alukkeet ja PCR-olosuhteet kirjaston seulonnassa nested-PCR-menetelmällä *hopAO1*, *hopD1* ja *hopM1*-mutanteilla. Tarkemmat PCR-olosuhteet on kerrottu taulukossa 1..

Geeni	Nested 1. PCR alukkeet	Alukkeiden sitoutumislämpötila	Ekstensio/Loppu-ekstensio	Nested 2. PCR alukkeet	Alukkeiden sitoutumislämpötila	Ekstensio/Loppu-ekstensio	<i>hop</i> -mutantti PCR-tuote
<i>hopAO1</i> 1407 bp	HopAO1out-Fwd /H8425-6 Rev	55 °C	2 min /7 min	HopAO1-Fwd Mu end primer	56°C	1 min 30 s /5 min	1000 bp
<i>hopM1</i> 2138 bp	HopM1 Nested out-Rev /H8425-5 Fwd	56°C	3 min 10 s /10 min	Hop M1 in-Rev Mu end primer	59°C	2 min /8 min	300 bp
<i>hopD1</i> 2117 bp	HopD1 out-Fwd /H8425-6 Rev	56°C	3 min /12 min	HopD1-Fwd Mu end primer	61°C	2 min /10 min	1200 bp

6.6.1 *Hop*-mutanttien eristäminen kirjastosta

Pst DC3000 -bakteerin pesäkekirjastosta seulottiin nested-PCR-menetelmällä bakteeriklooneja, joiden *hop*-geenissä oli KTn-transponi-insertio. Kirjaston yläpoolista KTnA1-A24 (600 pesäkettä/yläpooli) eristettiin PCR-seulontaa varten kromosomaalinen DNA yli yön kasvatuksesta. Templaattina PCR-reaktiossa oli n. 100 ng kromosomaalista DNA:ta eli 1 µl (gDNA c = 100 ng/µl). Kromosomaalinen DNA säilytettiin -20°C pakkasessa. Myöhemmissä alapoolien KTn1-124 (120 pesäkettä/alapooli) PCR-reaktioissa templaattina käytettiin bakteerisoluja kirjaston pesäkepooleista. Jotta PCR-reaktiossa olisi tasapuolisesti kaikki poolin sisältämät pesäkkeet edustettuna, glyserolistokista tehtiin yli yön kasvatus. Bakteerikasvatuksesta otettiin 500 µl:n näyte, joka sentrifugoitiin 2 min 9000 rpm ja sen jälkeen solut pestiin elatusaineen poistamiseksi kaksi kertaa 600 µl:lla steriiliä tislattua vettä. Lopuksi solut suspensoitiin 200 µl:aan steriiliä tislattua vettä, josta otettiin 2 µl templaattia PCR:ään. Kun saatiin paikannettua Mu-transposoni-insertio johonkin yksittäiseen alapooliin (sis. 120 pesäkettä), tehtiin kyseisen alapoolin glyserolistokista yli yön kasvatus. Kasvatuksesta maljattiin KB+Km(12,5) -maljoille sopivat laimennokset, jotta saatiin yksittäispesäkkeitä. Yksittäispesäkkeistä valittiin 150 pesäkettä, joista vedettiin viivat Grid(50)-maljoille (KB+Km12,5). Maljoja kasvatettiin 1-2 vrk +28°C. Grid-maljojen pesäkkeistä 15 pesäkettä yhdistettiin samaan PCR-templaattiin eli steriiliin tislattuun veteen sekoitettiin puutikulla pesäkkeitä, josta otettiin 5 µl PCR-reaktioon templaatiksi. Viidentoista pesäkkeen poolit nimettiin A-J. Tästä PCR-seulonnan positiivisesta poolista tehtiin vielä viimeinen PCR, oikean yksittäispesäkkeen löytämiseksi. Grid-maljalta tehtiin 15 yksittäispesäkkeestä steriiliin veteen sopivan samea solususpensio, josta otettiin 5 µl templaatti PCR:ään. Oikeasta yksittäispesäkkeestä tehtiin puhdasviljelmä ja siitä uusi tarkistus-PCR sekvensointia varten.

6.7 *Hop*-mutanttien virulenssitestaus tomaattien taimilla

Tomaattikasvit (*Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker) kasvatettiin siemenistä lähtien ruukussa, johon sekoitettiin 2/3 osaa hiekkapitoista erikoismultaa (Kekkilän kaktus ja kylvömulta) ja 1/3 osa vermikuliittia (Bröderne Nelsons PlantStart Vermiculite). Taimet kasvatettiin vallitsevassa lämpötilassa ikkunalaudalla luonnonvalossa toukokesäkuussa 35 vuorokautta. Suhteellinen kosteus oli 100%.

Tomaattien infektiota varten bakteereita kasvatettiin 2 vuorokautta KB-maljoilla +28°C:ssa. Bakteerit kerättiin sentrifugoimalla +4°C:ssa 4000 rpm 15 min, jonka jälkeen solut pestiin 10 mM MgCl₂-liuoksella. Bakteerit laimennettiin OD₆₀₀ 0,05 arvoon (=2,5 x 10⁷ CFU/mL) n. 2,5 l:n kokonaistilavuuteen 10 mM MgCl₂-liuosta. Tomaatin taimet infektoitiin kastamalla ne tähän bakteerisuspensioon, johon lisättiin juuri ennen kasvin kastamista 0,02% loppukonsentraatiossa pintajännitystä vähentävä Silwet L-77. Kasvia pidettiin bakteeriliuoksessa n. 20 sekuntia. Infektoidut kasvit suljettiin läpinäkyviin rei'itettyihin muovipusseihin ja niiden kasvatusta jatkettiin samoissa olosuhteissa kuin edellä on mainittu (kuva 7.).



KUVA 7. Tomaatin taimien infekointi. Tomaatin taimen infektio tehtiin kastamalla se bakteerisuspensioon. Infektoinnin jälkeen taimet huputettiin muovipusseihin.

Infektion etenemistä kasveissa seurattiin ja kasveista otettiin ajankohtina 0, 1, 2, 3, 5 ja 7 vrk infektiosta bakteerien lukumäärän laskentaa varten kolme erillistä lehteä per infektoitu kasvi. Lisäksi kasveista otettiin valokuvat infektion fenotyypin arviointia varten (kuva 8. ja kuva 12.). Kontaminaatioiden ehkäisemiseksi ja kasvin kasvuolosuhteiden optimoinnin takia jokaista aikapistettä varten oli kasvatettu oma kasvi, josta lehtinäytteet otettiin.

Patogeenisten bakteerien laskentaan kerättiin 3 erillistä lehteä per infektoitu kasvi, jotka käsiteltiin erillisinä näytteinä. Lehtiä huuhdottiin n. 1 min 70% etanoliliuoksessa ja sen jälkeen n. 1 min sterilissä tislatussa vedessä. Lehdet kuivattiin lyhyesti paperilla (blot dry). Pesuilla varmistettiin, että määrittelyyn tulevat ainoastaan kasvin lehden sisällä olevat bakteerit eivätkä epifyytiset bakteeripopulaatiot. Kasvitaudin aiheuttavat bakteerit ovat apoplastitilassa eivätkä lehden pinnalla. Pesun jälkeen lehdistä leikattiin korkkiporalla halkaisijaltaan 12 mm näyte (kuva 8.). Lehtipalat laitettiin koeputkiin,

joissa oli 100 µl 10 mM MgCl₂-liuosta ja teräskuula (halkaisija 5 mm). Lehtinäytteet jauhettiin kuulamylyllä 2 kertaa 20 sekuntia 30 Hz 1/s teholla. Tarvittaessa hajotus uusittiin, kunnes näytteet olivat täysin murskaantuneet eikä ehjiä lehden palasia ollut enää näkyvissä. Hajotettuihin lehtinäytteisiin lisättiin 900 µl 10 mM MgCl₂-liuosta, jolloin kokonaistilavuudeksi saatiin 1 ml. Näytteistä tehtiin laimennossarjat ja 10 µl:n tipat kuudesta eri laimennoksesta maljattiin joko KB-Rif(25) tai KB-Km(12,5)-maljoille. Maljoja kasvatettiin 2 vrk +28°C:ssa, jonka jälkeen laimennosten pesäkkeet laskettiin ja suhteutettiin lehtinäytteen pinta-alaan (CFU/cm²). (Ohje mukailtu Katagiri ym. 2002.)



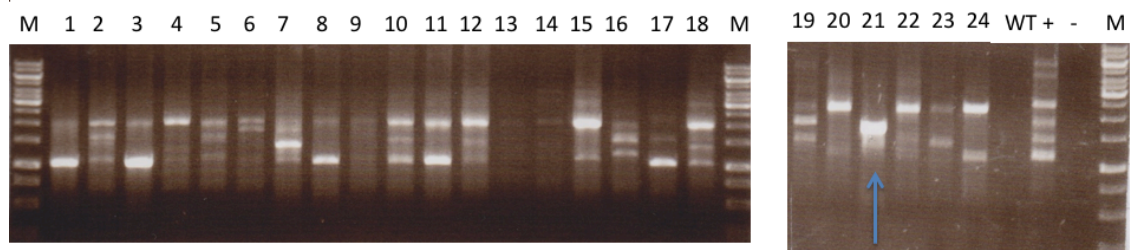
KUVA 8. Infektion eteneminen kasveissa ja lehtinäytteiden otto bakteerien lukumäärän laskentaan. Tomaatin taimi, joka on infektoitu villityypin–bakteerilla 3 vrk infektiosta (vasemmalla) taimi, joka on infektoitu *hopD1*-mutanttibakteerilla 3 vrk infektiosta (oikealla). Vasemmalla alakulmassa kuva villityypin bakteeri-infektiosta 7 vrk kohdalla. Kuvassa ylhäällä lehtinäytteiden otto korkkiporalla (d=12 mm) bakteerien lukumäärän laskentaa varten.

7 TULOKSET

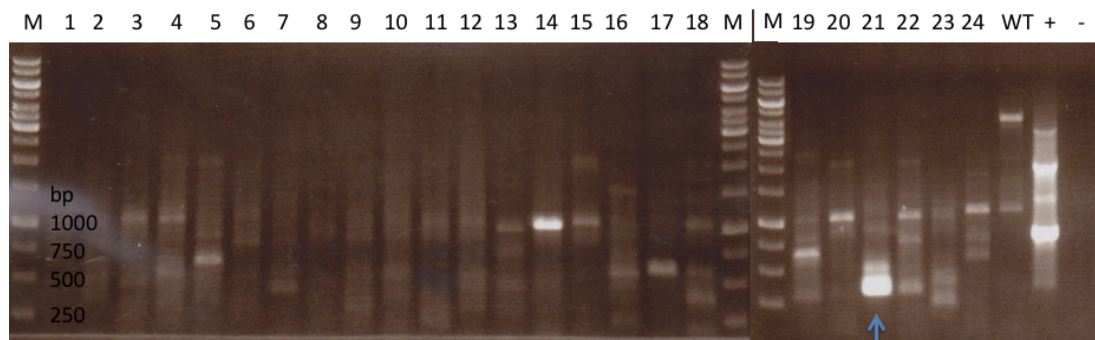
7.1 Kirjaston PCR-seulontamenetelmän optimointi

PCR:ssä esiintyi tuotteita frekvenssillä, joka kertoi, ettei kyse ole spesifisestä sitoutumisesta. Kokeiltiin useita eri PCR-menetelmiä, mm. ”touch-down” PCR:ää, jossa alukkeiden sitoutumislämpötila (annealing) oli PCR:n alussa reilusti oikeaa sulamislämpötilaa (T_m) korkeampi. Lämpötilaa laskettiin tästä asteittain (esim. 1-2°C joka toisella syklillä) kunnes saavutettiin todellinen alukkeiden sitoutumislämpötila ja jatkettiin sillä loput PCR-syklit normaalisti. Lopulta päädyttiin nested-PCR-menetelmään, joka on kaksivaiheinen (kuva 5., ks. menetelmät). Tässäkin menetelmässä ensimmäisessä PCR:ssä esiintyi tuotteita frekvenssillä, joka kertoi, ettei kyse ole spesifisestä sitoutumisesta (kuva 9.). Vasta toisessa PCR:ssä (nested-PCR) saatiin spesifiset tuotteet (kuva 9.). Lisäksi kokeiltiin erilaisia PCR-reaktioseosyhdistelmiä, joista päädyttiin käyttämään betaiinilisäystä (Sigma-Aldrich) 1 M loppukonsentraatiossa. Betaiini vähentää mm. GC-rikkaiden alueiden sekundaarirakenteiden muodostumista ja sitä kautta parantaa PCR-tuotteen saantoa ja spesifisyyttä (Frackman, S. ym. 1998).

A) 1. PCR:n tuotteet

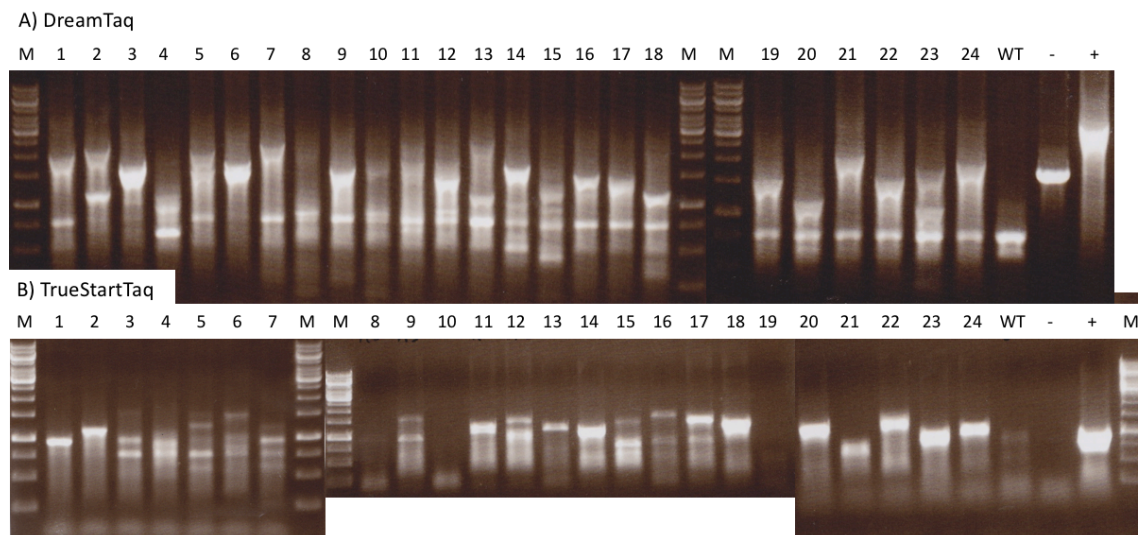


B) 2. PCR:n tuotteet



Kuva 9. Esimerkkikuva nested-PCR:n merkityksestä tuotteiden spesifisyyden parantamisessa. Ylhäällä geelikuvat (A) ensimmäisen PCR:n tuotteista ulkopuolen alukkeilla ja alhaalla geelikuvat (B) toisen PCR:n tuotteista sisäpuolen alukkeilla. Esimerkkikuvassa on monistettu *hopM1*-geeniä ja *hopM1*-mutantti löytyi A21-poolista (osoitettu kuvassa nuolella). Kuvassa M=molekyylipainomarkkeri (GeneRuler 1 kb DNA Ladder) ja 1-24 ovat kirjaston KTnA1-A24 yläpooleja (600 pesäketä/pooli). Lopussa kontrolleina on WT=*Pst* DC3000 villityypin gDNA, + = positiivinen kontrolli (aiemmissa PCR:ssä löydetty mutanttipooli) ja - = negatiivinen kontrolli (steriili vesi).

DNA-polymeraasina käytettiin ensin DreamTaq-entsyymiä (Thermo Fisher Scientific), jolla tuli paljon epäspesifisiä PCR-tuotteita. Vaihdettiin TrueStart Taq DNA -polymeraasiin (Thermo Fisher Scientific), joka on Hot start -entsyymi. Se aktivoituu vasta ensimmäisen denaturaation jälkeen. Tämä vähensi mahdollista alukkeiden epäspesifistä sitoutumista tai alukedimeerien (alukkeiden sitoutuminen toisiinsa) muodostumista ennen varsinaisen PCR-monistumisen aloitusta. PCR-olosuhteet pidettiin muuten samoina kuin DreamTaq -entsyymillä. Entsyymien vaihto vaikutti spesifisyyteen merkittävästi (kuva 10.). DreamTaq-entsyymi monisti myös villityypin genomista tuotetta toisin kuin TrueStart Taq -entsyymi (kuva 10.). Myöhemmät toisten *hop*-geenien PCR-reaktiot olivat vielä spesifimpiä, kuin kuvassa 10. oleva *hopCl*-geenin seulonta-PCR.



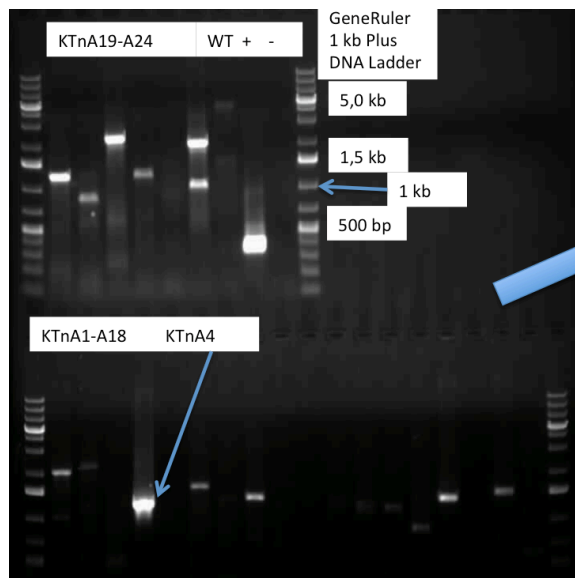
KUVA 10. Nested-PCR-tuotteiden spesifisyyden vertailu kahdella eri DNA-polymeraasilla Dreamtaq vs. TrueStart Taq. Ylhäällä geelikuvat (A) DreamTaq DNA-polymeraasilla tehty kirjaston seulonta *hopCl*-geenistä ja alhaalla geelikuvat (B) TrueStart Taq DNA-polymeraasilla tehty vastaava seulonta. Kuvassa M=molekyyliainomarkkeri (GeneRuler 1 kb DNA Ladder) ja 1-24 ovat kirjaston KTnA1-A24 yläpooleja (600 pesäkettä/pooli). Lopussa kontrolleina on WT=*Pst* DC3000 villityypin gDNA, + = positiivinen kontrolli (aiemmissa PCR:ssä löydetty mutanttipooli) ja - = negatiivinen kontrolli (steriili vesi).

7.2 Transposoni-insertioiden seulonta

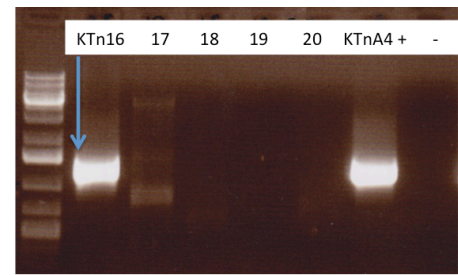
Kirjaston seulonnassa nested-PCR-menetelmällä löydettiin *Pst* DC3000 -bakteerin *hopD1*, *hopAO1* ja *hopM1*-geeneistä KTn-transposoni-insertiot. Toisen vaiheen nested-PCR:ssä sisäpuolen aluke MuEnd Primer sitoutuu transposonin Mu-alueen sekvenssiin ja monistaa näin tuotetta transposoni-insertiokohdasta eteenpäin ja alukeparina oleva Hop-

geenin aluke vastavaasti monistaa toisesta päästä kohti transposonia. Esimerkiksi *hopD1*-geeni on kooltaan 2117 bp, jolloin PCR:ssä haettiin tuotetta, joka on pienempi kuin kyseinen geeni. Toisessa nested-PCR-reaktiossa MuEnd Primer/HopD1-F -alukkeilla monistui n. 1200 bp tuote (taulukko 3.). *HopD1*-geenin kirjaston seulonnassa saatiin vahvin PCR-tuote kirjaston yläpoolista KTnA4, muita melko vahvoja ja spesifisiä tuotteita oli KTnA19 ja KTnA21 yläpooleissa (kuva 11.). Aiempien geenien seulonnoissa oli havaittu, että heikot tuotteet olivat usein virheellisiä tuotteita eikä alapooleista enää löydetty samaa tuotetta. Oikea mutanttiklooni *hopD1*-geenistä paikannettiin HopD1/KTn16 alapoolin pesäkkeeseen 107 (kuva 11.). Kontrollina kaikissa yläpoolien PCR-seulonnoissa oli mukana villityypin *Pst* DC3000 -bakteerin gDNA, jotta voitiin erottaa mahdolliset epäspesifiset sitoutumiset. Villityypissä ei ole sitoutumiskohtaa MuEnd Primer -alukkeelle, jolloin sieltä ei pitäisi monistua mitään tuotetta. Positiivisena kontrollina PCR-seulonnoissa käytettiin ensimmäisessä seulonnassa löytynyttä oikeaa mutanttiyläpoolia. Negatiivisessa kontrollissa oli templaattina steriili vesi, jota oli käytetty PCR-seoksen tekemisessä. Vesikontrollilla varmistettiin, ettei PCR-reaktioissa ollut tapahtunut kontaminaatioita.

HopAO1-geenistä (1400 bp) löydettiin KTn-transposoni-insertio kirjaston seulonnassa MuEnd Primer/HopAO1-F -alukkeilla, jolloin nested-PCR:ssä monistui n. 1000 bp kokoinen tuote. *HopM1*-geenistä (2138 bp) kirjaston seulonnassa HopM1 in-Rev/MuEnd Primer -alukkeilla monistui n. 300 bp PCR-tuote, joka sisälsi KTn-transposoni-insertion (taulukko 3.).

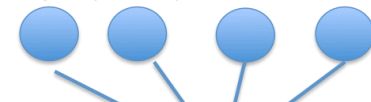


1) Kirjaston seulonta KTnA1-24 yläpoolit (a'600 pesäkettä)
Kirjasto sisältää yhteensä n. 14 000 pesäkettä



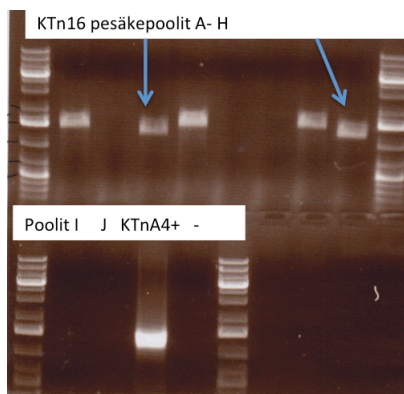
2) KTnA4 koostuu KTn16-20 alapoolista
(a'120 pesäkettä), joista KTn16 sisältää
oikean kloonin

3) KTn16 alapoolista yli yön liuoskasvatus ja
maljaus yksittäispesäkkeiksi



4) Poimitaan 150 pesäkettä Grid(50) -maljoille
viivaksi ja kasvatetaan yli yön

5) Tehdään PCR seulontaa varten 10 kpl 15 pesäkkeen
pooleja A-J steriiliin veteen, josta
5 µl templaatti PCR-reaktioon



6) KTn16 yksittäispesäkkeiden poolit A-J
(ä 15 pesäkettä Grid-maljalta)
Poolit C ja H oikea n. 1200 bp tuote

7) Pooli H sisältää pesäkkeet 106-120
Grid-maljalta tehdään näistä
yksittäispesäkkeistä steriiliin veteen
templaatti 5 µl PCR-reaktioon



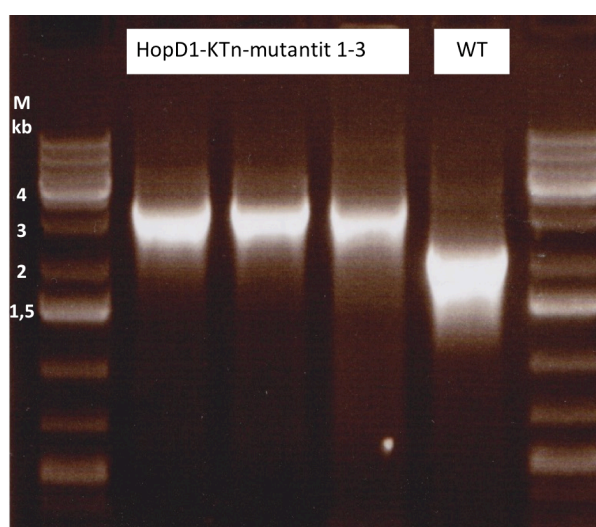
7) Pesäkepooli H:n yksittäispesäkkeet 106-120
Pesäkkeistä 107 ja 114 tulee oikea
tuote n. 1200 bp

8) Oikeasta yksittäispesäkkeestä 107
tehdään Grid50-maljan viivasta
puhdasviljelmä

9) Puhdasviljelmästä tehdään glyserolistokki
-80 C säilytykseen
sekä tarkistus PCR ja tuotteen sekvensointi

KUVA 11. Hop-mutanttien seulonta kirjastosta nested-PCR-menetelmällä käyttäen esimerkkinä hopD1-geenin seulontatulosten agarosigeelikuvia. (1) Kirjaston seulonta KTnA1-A24 yläpoolista (600 pesäkettä/pooli) nested-PCR-menetelmällä. *HopD1*-geeni on kooltaan 2117 bp ja MuEnd Primer/HopD1-F -alukkeilla monistuu n. 1200 bp tuote. (2) Yläpooli KTnA4 koostuu KTn16-20 alapoolista (120 pesäkettä/alapooli). (3-5) Alapooli KTn16 yli yön kasvatus maljataan yksittäispesäkkeiksi, joista seulotaan n. 120-150 yksittäispesäkettä oikean mutanttikloonin löytämiseksi (6-7). Agarosigeeleissä on käytetty markkerina GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Hop-geeneissä olevien transposoni-insertioiden varmistamiseksi tehtiin vielä PCR-reaktioita eri alukepariyhdistelmillä (kuva 12.). *HopD1*, *hopAO1* ja *hopM1*-mutanteista sekä villityypistä *Pst* DC3000 tehtiin PCR-reaktiot kyseisen *hop*-geenin monistavilla alukkeilla (Fwd/Rev), jolloin KTn-transposoni-insertion sisältävistä mutanteista monistui KTn-transposonin koon verran (1291 bp) isompi tuote kuin villityypin pelkästä *hop*-geenistä. MuEnd Primer ja *Hop*-geeni-Fwd/Rev -alukkeilla *hop*-mutanteista monistui vastaava PCR-tuote, kuin taulukossa 3., riippuen siitä missä kohtaa geeniä KTn-transposoni-insertio sijaitsi. Villityypistä sen sijaan ei monistunut näillä alukkeilla tuotetta ollenkaan, koska siinä ei ollut sitoutumiskohtaa Mu-alueen 50 bp:n toistojaksoon sitoutuvalle MuEnd Primer -alukkeelle.



KUVA 12. *Hop*-geenimutanttien transposoni-insertioiden varmennus tarkistus-PCR-reaktioilla. Esimerkkikuvassa *hopD1*-mutantin ja villityypin PCR-reaktiot, joissa on käytetty *hopD1*-geenin monistavia alukkeita HopD1-Fwd/HopD1-Rev. KTn-transposoni on kooltaan 1291 bp ja *hopD1*-geeni on kooltaan 2117 bp. *HopD1*-mutantista, jossa oli *hopD1*-geenin sisällä KTn-transposoni-insertio, monistuu sekä transposoni (1291 bp) että *hopD1*-geeni (2117 bp), jolloin PCR-tuote oli kooltaan 3408 bp. Kontrollina mukana oli villityypin *Pst* DC3000, josta monistui pelkkä *hopD1*-geeni kooltaan 2117 bp. (Kuvassa M=molekyylipainomarkkeri, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder)

7.3 *HopD1*, *hopAO1* ja *hopM1*-geenien vaikutus *Pst* DC3000 -bakteerin taudinaiheutuskykyyn tomaatin taimissa

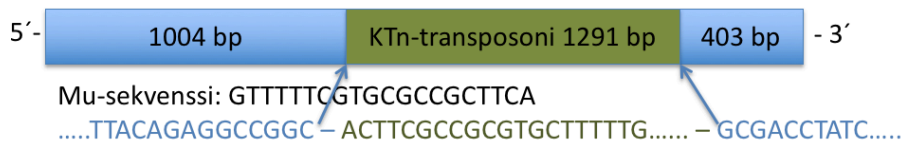
HopD1, *hopAO1* ja *hopM1*-geenien sisälle oli viety KTn-transposoni-insertio MuA-transpositiokompleksina elektroporaatiolla villityypin *Pst* DC3000 -bakteerin kompetentteihin soluihin. *Hop*-geenimutanttien transposoni-insertioiden kohta geeneissä paikannettiin sekvensoimalla KA1608 ja KA1408-alukkeilla (liite 4.), jotka monistavat transposonin kanamysiinin resistenssigeenistä ulospäin. Sekvensointitulosten sekvenssiä

verrattiin TIGR-tietokannan *hop*-geenien sekvenssiin (liite 3.). *HopAOI*- ja *hopMI*-geeneissä KTn-transposoni-insertio paikannettiin geenin loppuosaan ja *hopDI*-geenissä insertio oli geenin keskellä (kuva 13.). *Lycopersicon esculentum* cv. MoneyMaker -tomaatin taimet kastettiin bakteerisuspensioihin, jotka sisälsivät joko villityypin *Pst* DC3000 -bakteeria, *hrpA*, *hopDI*, *hopAOI*, *hopMI*-mutanttibakteeria tai pelkkää $MgCl_2$ -liuosta. Kasveista otettiin kolme erillistä lehteä per infektoitu kasvi bakteerien lukumäärän laskentaa varten ajankohtina 0, 1, 2, 3, 5 ja 7 vrk infektiosta sekä fenotyypin kuvausta varten aikapisteissä 3, 5 ja 7 vrk, jolloin täplätaudille tyypilliset leesiot olivat ehtineet muodostua (kuva 14. ja kuva 15.).

$MgCl_2$ -liuos toimi negatiivisena kontrollina, jonka lehtinäytteissä ei ollut bakteerikasvua eikä myöskään fenotyypissä muutoksia (kuva 14. ja kuva 15.). *HrpA*-mutanttibakteeri toimi avirulentin bakteerikannan vertailukohteena, jonka lehtinäytteissä bakteerien lukumäärä pysyi suurin piirtein infektion alkupisteen (0 vrk) tasolla ja fenotyypissä ei ollut muutoksia. *HrpA*-näytteiden bakteerien lukumäärissä oli pientä vaihtelua eri aikapisteissä, mikä johtui laimennossarjan laskennallisesta epätarkkuudesta (kuva 15.). Villityypin *Pst* DC3000 -bakteeri toimi vertailukohteena bakteerin normaalin patogeenesisen etenemiselle kasvissa. Villityypissä bakteerien lukumäärä kasvoi 5 vuorokauteen asti, mutta 7 vuorokauden kohdalla bakteerien lukumäärä oli kääntynyt jo laskuun. Tomaatin taimet olivat 7 vuorokauden kohdalla jo todella huonokuntoisia ja infektoituneet lehdet sekä lehtien varret tippuivat alas (kuva 8.) eli bakteerit olivat saavuttaneet huippulukemansa jo ennen tätä. Badel ym. (2006) bakteerien lukumäärä kääntyi laskuun jo 5. vuorokauden kohdalla. *Pst* DC3000 -bakteeri on hemibiotrofinen eli kasvisolut alkavat kuolla vasta kun bakteerit ovat ehtineet lisääntyä lähestulkoon huippulukemaansa (Xin & He 2013).

HopAO1-geeni, koko 1407 bp (PSPTO_4722) 5'- 534 7118 - 534 8524 -3'

KTn-insertio geenin lopussa: PCR-tuote HopAO1-Fwd ja Mu end primer -alukkeilla 1000 bp



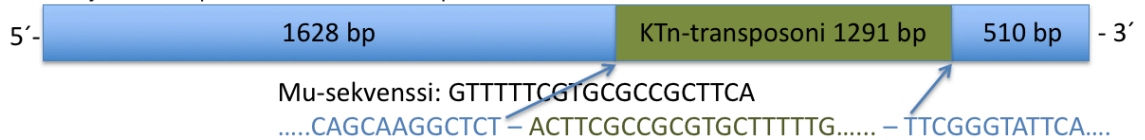
HopD1-geeni, koko 2117 bp (PSPTO_0876) 5'- 946 222 - 948 339 -3'

KTn-insertio geenin keskellä: PCR-tuote HopD1-Fwd ja Mu end primer -alukkeilla 1200 bp



HopM1-geeni, koko 2138 bp (PSPTO_1375) 5'- 151 1461 - 151 3599 -3'

KTn-insertio geenin lopussa: PCR-tuote HopM1 in-Rev (-188 bp sisäänpäin geenin lopusta) ja Mu end primer -alukkeilla 300 bp



KUVA 13. KTn-transposoni-insertiokohdat hop-geeneissä. Transposoni ja sen osittainen sekvenssi on merkitty kuvaan vihreällä. Hop-geeni ja sen sekvenssi transposoni-insertion liitoskohdissa on kuvassa sinisellä. Tarkemmat sekvenssitiedot ovat liitteessä 3. ja 4.

7.3.1 HopM1-mutantit taudinaiheutuskyky

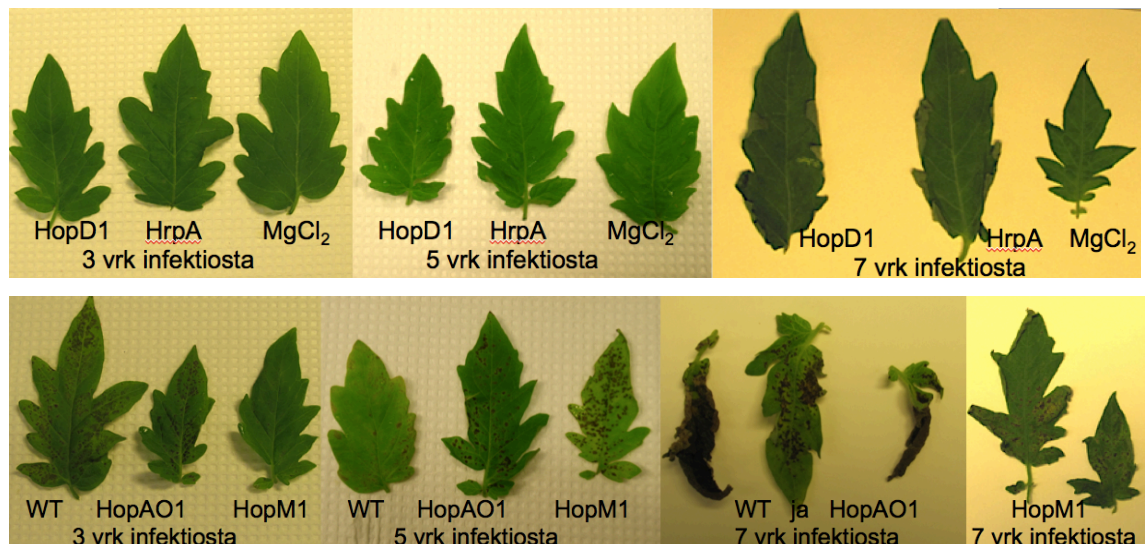
KTn-transposoni-insertion paikka *hopM1*-geenissä oli varmennettu sekvensoinnissa geenin loppupäähän (kuva 13.). *HopM1*-mutantin kasvissa näkyi 3 vuorokauden kohdalla muutama leesio, kun taas villityypissä niitä oli koko lehden täydeltä useita (kuva 14.). 7 vuorokauden kohdalla leasioita oli vain n. puolet lehtien pinta-alasta, kun taas villityypissä suurin osa lehdistä oli jo kuollut ja lähes kauttaaltaan mustuneita. *HopM1*-mutanttibakteerin leesioiden tuotto oli siis heikentynyt verrattuna villityyppiin. *HopM1*-mutanttibakteerien lisääntyminen kasvissa hidastui verrattuna villityyppiin (kuva 15.). *HopM1*-mutanttibakteerien määrä jatkoi kasvua vielä 7 vuorokaudenkin kohdalla, kun muilla bakteerikannoilla se oli kääntynyt silloin jo laskuun. Näin ollen on mahdollista, että *HopM1*-mutaatio ei vaikuttanut bakteerien lisääntymiskykyyn muuten kuin vain hidastamalla sitä.

7.3.2 *HopAO1*-mutantin taudinaiheutuskyky

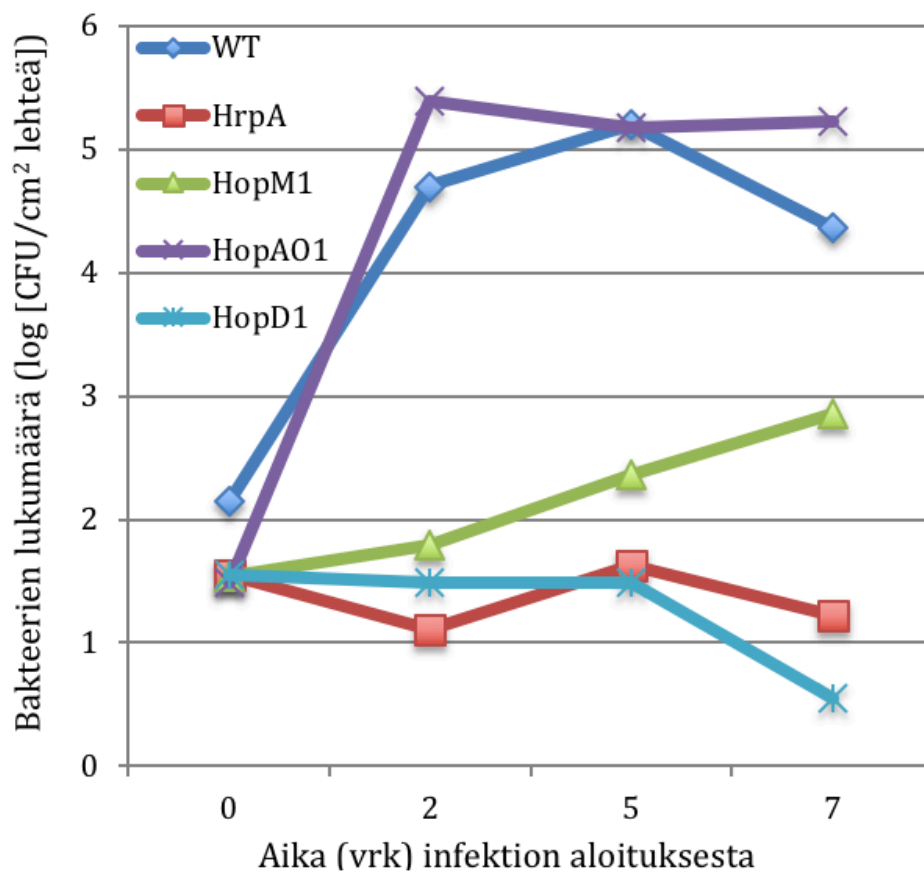
KTn-transposoni-insertion paikka *hopAO1*-geenissä oli varmennettu sekvensoinnissa geenin loppupäähän (kuva 13.). Villityypin ja *hopAO1*-mutanttibakteerien infektiot etenivät lähes samalla tavalla. Kasvien fenotyypissä oli 3 vuorokauden kohdalla nähtävissä useita leesioita ja 7 vuorokauden kohdalla suurin osa lehdistä oli kuollut ja lähes kauttaaltaan mustuneita, kuten villityypissäkin. *HopAO1*-mutanttibakteerien lisääntyminen kasvisoluissa oli jopa hieman nopeampaa kuin villityypillä (kuva 14.). Eli *hopAO1*-geenin mutaatiolla ei ollut vaikutusta leesioden tuottoon eikä lisääntymiskykyyn.

7.3.3 *HopD1*-mutantin taudinaiheutuskyky

KTn-transposoni-insertion paikka *hopD1*-geenissä oli varmennettu sekvensoinnissa suurin piirtein geenin keskelle (kuva 13.). *HopD1*-mutanttibakteeri ei pystynyt lisääntymään kasvissa lainkaan. Bakteerien lukumäärät pysyivät 0 vuorokauden tasolla viiteen vuorokauteen asti ja 7 vuorokauden kohdalla ne jopa laskivat aloitustasosta (kuva 15.). Mutanttibakteeri ei pystynyt aiheuttamaan tautia kasvissa. Kasvin fenotyyppi pysyi normaalina, samoin kuin avirulentilla *hrpA*-mutanttibakteerilla ja negatiivisella kontrollilla $MgCl_2$ -liuoksella (kuva 14.).



KUVA 14. *Pst DC3000* -mutanttibakteerien kyky aiheuttaa tomaatissa (*Lycopersicon esculentum* cv. *MoneyMaker*) tautiin liittyviä mustia täpliä (leesioita) 3, 5 ja 7 vuorokautta infektioiden aloituksesta. Ylärivissä avirulentit *hopD1* ja *hrpA*-mutanttibakteerit sekä negatiivinen kontrolli $MgCl_2$ -liuos. Alarivissä virulentit *hopAO1* ja *hopM1*-mutanttibakteerit sekä villityypin.



KUVA 15. *Pst DC3000* -mutanttibakteerien kyky kasvaa tomaatin lehdissä. Elävien bakteerien lukumäärä lehdissä arvioitiin aikapisteissä 0, 2, 5 ja 7 vuorokautta infektion aloituksesta. Infektio aloitettiin kastamalla kasvit bakteerisuspensioon ($2,5 \times 10^7$ CFU/ml). Jokainen aikapiste kuvaa elävien bakteerien keskiarvoa, joka on laskettu kolmesta erillisestä lehdestä otetusta 12 mm:n halkaisijan lehtipalasta (lehtinäytteen pinta-ala = 1,131 cm²). Negatiivisessa kontrollissa MgCl₂-liuoksella ei ollut bakteerikasvua maljoilla lainkaan (ei näkyvissä kuvaajalla).

8 TULOSTEN TARKASTELU

Tässä tutkimuksessa hyödynnettiin Lamberg ym. (2002) kehittämää faagi Mu:n DNA:n transpositioon perustuvaa mutageneesimenetelmää, jolla voi tehdä insertiomutantteja kohdebakteerin genomiin. Menetelmässä kootaan *in vitro* yhteen transposonin DNA ja MuA-transposaasientsyymi transpositiokompleksiksi ja viedään se elektroporaatiolla kohdebakteerin elektrokompetentteihin soluihin. Pajunen ym. (2005) totesivat MuA-transpositiokompleksin toimivaksi mutanttikirjaston tekemiseen gram-positiivisilla bakteereilla. Tässä työssä valmistettiin uudella tavalla pesäkepooleina mutanttikirjasto gram-negatiivisen *Pst* DC3000 -bakteerin genomista. MuA-transpositiokompleksi valittiin mutaatiomenetelmäksi, koska sen oli todettu tekevän vain yhden insertion genomiin ja kirjasto soveltuisi näin ollen virulenssigeenien testaukseen (Lanckriet ym. 2009). Mutanttikirjaston olisi voinut tehdä myös esim. Tn5-transposonilla *in vivo*, mutta tällöin transposoni-insertioita olisi tullut useampia. Lisäksi konjugaatiossa donorikantana käytettävä *E. coli* sisältää faagi Mu:n DNA:ta, joka voisi periaatteessa myös siirtyä konjugaatiossa ja tehdä vielä Mu-insertioita genomiin. (Gallagher ym. 2013, Liberati ym. 2006). Tarkoituksena tässä työssä oli päästä tutkimaan yksittäisen *hop*-geenin mutaation vaikutusta *Pst* DC3000 -bakteerin taudinaiheutuskykyyn. Tämän työn tarkoituksena oli kuitenkin testata nimenomaan Savilahden tutkimusryhmän kehittämän MuA-transpositiokompleksin käyttömahdollisuuksia.

Kirjaston *hop*-geenimutanttien seulontaan kehitettiin uusi siihen soveltuva nested-PCR-menetelmä, jolla saatiin paikannettua suuremmista pesäkepooleista transposoni-insertio yhteen bakteeripesäkkeeseen. PCR-seulontamenetelmän optimoinnissa oli vaikeuksia epäspesifisten tuotteiden ja ”valepositiivisten” tuotteiden kanssa, mikä saattoi johtua myöhemmin todetusta kirjaston kaksoismutanttien olemmassaolosta. Epäspesifisiin tuotteisiin saattoi vaikuttaa myös, että transposonin Mu-päiden toistojaksot voivat sitoutua keskenään ja muodostaa eräänlaisia hiuspinnirakenteita tai PCR:n aikana muodostui rekombinaatiotuotteita. Lisäksi *Pst* DC3000 -bakteerilla on paljon toistojaksoja genomissa, esim. *E. coli* -bakteerissa PCR-seulonta olisi voinut olla helpompaa. PCR-tuotteiden spesifisyyttä saatiin parannettua kaksivaiheisella nested-PCR-menetelmällä. Ensimmäisen PCR:n tuotteissa esiintyi tuotteita frekvenssillä, joka kertoi, ettei kyse ollut spesifisestä sitoutumisesta. Tarvittiin vielä toinen PCR (nested-PCR), jotta saatiin spesifiset tuotteet.

Tässä työssä löydettiin nested-PCR-seulontamenetelmällä transposoni-insertiot *Pst* DC3000 -bakteerin kolmesta eri *hop*-efektoriproteiinigenistä, *hopAO1*, *hopM1* ja *hopD1*, ja niiden vaikutusta taudinaiheutuskykyyn testattiin tomaattikasveilla. Monien *Pst* DC3000 -bakteerin Hop-efektoriproteiinien toiminta ja kohteet kasvisoluissa on jo selvitetty (Deslandes & Rivas 2012, Block ym. 2011, Xin & He 2013), mutta myös monien efektoriproteiinien kohteet kasvisoluissa ovat edelleen tuntemattomia. Kaikkien efektoriproteiinien tehtävä ei välttämättä liity kasvin immuunipuolustuksen estoon, vaan ne voivat edistää esim. bakteerin ravinteiden saantia ympäristöstä. Muutoinkin yksittäisten efektoriproteiinien tehtävät ovat hyvin vaihtelevia, yhdellä efektoriproteiinilla voi olla useita eri kohteita (esim. HopM1) tai useita eri aktiivisuuksia ja tehtäviä (esim. AvrPtoB) tai sitten vain yksi spesifi kohde ja tehtävä (Macho ym. 2015).

Aiemmat *hopAO1*-deleetiomutantien virulenssitestaukset on tehty joko *Arabidopsis thaliana* -kasvilla (Underwood ym. 2007, Macho ym. 2014) tai *Nicotiana benthamiana* -kasvilla (Espinosa ym. 2003, Bretz ym. 2003), joissa kaikissa havaittiin bakteerin lisääntymiskyvyn kasvin lehdistä heikentyneen. Underwood ym. (2007) eivät kuitenkaan havainneet mitään muutosta deleetiomutantien ulkoisessa taudinaiheutuskyvyssä lituruohossa verrattuna villityyppiin. Tässä tutkimuksessa ei havaittu *hopAO1*-deleetiolla vaikutusta bakteerin lisääntymiskykyyn eikä oireiden aiheuttamiseen kasville. Syynä tähän aiemmista tutkimuksista poikkeavaan tulokseen voisi olla, että infektion kohteena oli eri kasvi, *Lycopersicon esculentum*. Aiemmissakaan tutkimuksissa bakteerien lukumäärän vähentyminen verrattuna villityyppiin ei ollut kovin suuri. Usein yhden efektoriproteiinin puutos ei vielä vaikuta bakteerin taudinaiheutuskykyyn, koska efektoriproteiineilla on osittain päällekkäisiä tehtäviä ja osa niistä toimii myös yhteisapelillä. HopAO1-efektoriproteiinilla on vain yksi toiminnallinen ominaisuus, tyrosiinifosfataasiaktiivisuus, sekä ainakin toistaiseksi on tiedossa vain yksi toiminnallinen kohde, kasvin PR-reseptorien kinaasiosan tyrosiiniaminohapon fosfaattien poisto. Lisäksi AvrPtoB ja AvrPto-virulenssiproteiinit vaikuttavat osittain näihin samoihin kohteisiin. Näin ollen voisi olla hyvin todennäköistä, ettei pelkällä HopAO1-efektoriproteiinin puutoksella olisi vaikutusta *Pst* DC3000 -bakteerin taudinaiheutuskykyyn (Macho & Zipfel 2015).

HopM1-efektoriproteiinilla on useampia vaikutuskohteita kasvisolussa. Se vaikuttaa mm. kasvin vesikkeliliikenteeseen, ilmarakojen aukipitoon sekä AtMIN7-proteiiniin, jota tarvitaan sekä kasvin aikaisen vaiheen immuniteetissa (PTI), että myöhäisemmässä

vaiheessa (ETI) (Lozano-Duran ym. 2014). Useilta muiltakin kasvipatogeenisilta *P. syringae* -bakteerikannoilta löytyy konservoitunut efektorilokus (CEL), jossa *hopM1* sijaitsee. Lisäksi sen on todettu olevan yksi *Pst* DC3000 -bakteerin virulenssikyvyn palautukselle välttämättömistä Hop-efektoriproteiineista (Cunnac ym. 2011), joten oletuksena oli HopM1 puutoksen heikentävän bakteerin taudinaiheutuskykyä jollain tavalla. Tässä tutkimuksessa transposoni-insertio *hopM1*-geenissä heikensi *Pst* DC3000 -bakteerin leesioiden tuottoa tomaatissa, kuten aiemmissakin tutkimuksissa oli havaittu (Badel ym. 2003). Sen sijaan poikkeava tulos aiempiin tutkimuksiin (Badel ym. 2003) oli, että *hopM1*-mutanttien lisääntyminen kasvisoluissa oli selkeästi hidastunut verrattuna villityyppiin. Badel ym. (2006) mukaan vasta molempien *hopM1* ja *avrE*-efektorigeenien deletio heikensi bakteerien lisääntymistä. Pelkällä *hopM1* deletiolla ei ollut vaikutusta bakteerien lisääntymiseen. Tosin HopM1-efektorilla todettiin bakteerien kasvua lisäävä vaikutus, kun se yhdistettiin AvrPto ja AvrPtoB-efektorien kanssa (Cunnac ym. 2011). Kvitko ym. (2009) totesivat myös *Nicotiana benthamiana* -kasvilla ja tomaatilla Δ CEL-mutanttibakteerien (sis. *hopM1*, *avrE*, *hopAAI-1* ja *hopNI*-geenit) kasvun olevan vahvasti heikentynyt. Kuten jo aiemmin on todettu, transposoni-insertioita on voinut olla useampi eli mahdollisesti toinen transposoni-insertio on vaikuttanut bakteerin lisääntymiseen? Toisaalta mutanttibakteerien lisääntyminen kasvissa oli ainoastaan hidastunut eikä kokonaan estynyt, kuten avirulenteilla *hrpA* ja *hopD1*-mutanteilla.

HopD1-mutantti oli avirulentti omissa testeissä, mutta myöhemmissä tutkimuksissa selvisi, että se olikin itse asiassa kaksoismutantti. Mutaatio oli *hopD1*-geenin lisäksi myös toisessa geenissä. Tutkimuksen suorittamisen aikaan (2009) oli hyvin vähän tutkimustietoa saatavilla HopD1-efektoriproteiinin virulenssiominaisuuksista, joten ei tiedetty mitä tuloksia voisi odottaa. Myöhemmin on todettu HopD1-efektoriproteiinin vaikuttavan ainoastaan kasvin ETI-reaktioon eikä lainkaan PTI-reaktioon (Block ym. 2014). Bakteerilla täytyy olla puolustuskeinot kasvin ensimmäisen vaiheen PTI-immuunipuolustuksen estoon, jotta se pääsee aloittamaan infektiota. ETI-reaktioon vaikuttavien efektoriproteiinien on arveltu kehittyneen evoluutiossa vasta PTI-reaktioon vaikuttavien efektoriproteiinien jälkeen (Block ym. 2014). Näin ollen voisi olettaa, että *hopD1*-mutaation lisäksi ollut toinen mutaatio olisi kohdentunut johonkin näistä ensimmäisen vaiheen PTI-reaktioon vaikuttavista efektoriproteiineista, koska kyseinen mutantti oli täysin avirulentti sekä fenotyyppisesti, että bakteerin lisääntymisen suhteen.

Tosin kaikkiin näihin kolmeen mutantiin, *hopAOI*, *hopMI* ja *hopDI*, vaikuttaa se, että myöhemmin todettiin MuA-transposonin tehneen useamman kuin yhden insertion *Pst* DC3000 -bakteerin genomiin. Sekvensoinneissa varmistettiin vain kyseisen *hop*-geenin mutaatio. Muita geenialueita ei tutkittu, koska oletuksena oli MuA-transposonin tekevän vain yhden insertion (Lanckriet ym. 2009). Ilmeisesti mutanttikirjaston valmistusta edeltänyttä elektroporaatiovaihetta olisi pitänyt optimoida tarkemmin. Nyt MuA-transpositiokompleksin pitoisuus oli ilmeisesti liian suuri, jolloin useampi kompleksi pystyi menemään samaan soluun tehden sattumanvaraisen insertion useampaan kohtaan bakteerin genomissa. Sen sijaan kasvitestien luotettavuutta lisäsi tässä työssä käytetty bakteerisuspensioon kastamis -menetelmä (dippaus), joka on todettu luonnollisemmaksi ja sitä kautta luotettavammaksi tavaksi tutkia mutanttien vaikutuksia taudinaiheutuskykyyn kuin esim. ruiskuinfiltraatiomenetelmä (Kvitko ym. 2009).

Tutkimuksia oli tarkoitus jatkaa poistamalla *Pst* DC3000 -mutanttikannoista antibioottimarkkeri Cre-lox-mekanismilla ja tehdä sen jälkeen *hop*-efektorigeenien suhteen kaksoismutanteja, joiden vaikutuksia bakteerin taudinaiheutuskykyyn olisi testattu lisää. KTn-transposonin päissä oli lox-tunnistuskohdat kanamysiini antibioottiresistenssigeenin poistoa varten (kuva 4.).

Tyypin III erityismekanismi ja sen kautta eritetyt efektoriproteiinit ovat välttämättömiä monien patogeenisten bakteerien virulenssille, mikä tekee niistä myös erinomaisia kohteita lääkekehittelylle. Esimerkiksi ihmispatogeeni *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeria vastaan on kehitetty rokote, joka on kohdennettu sen T3SS-mekanismiin rakenteessa olevan translokaatiokompleksin PcrV-osaa kohtaan. Efektoriproteiinit lääkkeiden kohteena on ongelmallisempi, koska niiden toiminnoissa on päällekkäisyyksiä ja ne saattavat vaihdella eri bakteerikantojen välillä. Tosin *P. aeruginosa* -bakteerin ExoS ja ExoU-efektoriproteiineja vastaan on tehty mm. kemiallisia inhibiittoreita. Uusista lääkekohteista olisi hyötyä myös taistelussa antibiooteille moniresistenttejä bakteerikantoja vastaan (Charro & Mota 2015, Costa ym. 2015). *Pst* DC3000 -bakteerin virulenssimekanismien tutkimuslöydöksiä on melko vähän hyödynnetty käytännön sovellutuksiksi, mikä voisi olla hyvä ottaa tulevaisuuden tutkimusten tavoitteeksi (Xin & He 2013). Kasvien immuunipuolustus toki poikkeaa tietyin osin ihmisten immuunipuolustuksesta, kuten vasta-aineet puuttuvat kasveilta ja niiden puolustus ilmenee niiden perimän muuntumisena geenigeenistä resistenssin periaatteella. *Pst* DC3000 -bakteerin taudinaiheutusmekanismien löydöksiä on kylläkin

pystytty hyödyntämään toisten kasvipatogeenien toiminnan ymmärtämisessä (Dou & Zhou 2012).

9 KIITOKSET

Tämän pro gradu –tutkielman kokeellinen osuus tehtiin pääsääntöisesti Helsingin yliopiston, Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen perinnöllisyystieteen laboratoriossa, jossa työn ohjaajana toimi dosentti Hannu Saarilahti. Biotekniikan instituutissa Solubiotekniikan tutkimusohjelman laboratoriossa Mu-transpositiokompleksin valmistuksen ohjasi dosentti Maria Pajunen.

Haluan kiittää tutkielman ohjaajiani dosentti Maria Pajusta MuA-transpositiokompleksin valmistuksen opastuksesta sekä erityisesti dosentti Hannu Saarilahtea varsinaisen tutkielman laboraatio-osuuden menetelmien yms. ohjauksessa ja kirjoitusurakan pitkäjänteisessä ohjauksessa. Haluan kiittää myös FT Kukka Ahoa erityisesti kasvien virulenssitestaukseen liittyvistä laboratorio-ohjeistuksista ja laitteiden käyttöopastuksista.

Erityisen suuri kiitos perheelleni, jotka jaksoivat kannustaa ja auttaa muun arjen pyörittämisessä tutkielman loppuun saattamiseksi.

10 LÄHTEET

Alfano, J.R. & Collmer, A. 1997. The Type III (Hrp) Secretion Pathway of Plant Pathogenic Bacteria: Trafficking Harpins, Avr Proteins, and Death. *Journal of Bacteriology*. 179(18):5655-5662.

Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K. & Collmer, A. 2000. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(9):4856-4861.

Almeida, N.F., Yan, S., Lindeberg, M., Studholme, D.J., Schneider, D.J., Condon, B., Liu, H., Viana, C.J., Warren, A., Evans, C., Kemen, E., MacLean, D., Angot, A., Martin, G.B., Jones, J.D., Collmer, A., Setubal, J.C. & Vinatzer, B.A. 2009. A draft genome sequence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* T1 Reveals a Type III Effector Repertoire Significantly Divergent from That of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22(1):52-62.

Arakawa, H., Lodygin, D. & Buerstedde, J-M. 2001. Mutant loxP vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs. *BioMed Central Biotechnology*. 1(7): doi: 10.1186/1472-6750-1-7.

Asai, S. & Shirasu, K. 2015. Plant cells under siege: Plant immune system versus pathogen effectors. *Current Opinion in Plant Biology*. 28:1-8.

Badel, J.L., Shimizu, R., Oh, H-S. & Collmer, A. 2006. A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* avrE1/hopM1 mutant is severely reduced in growth and lesion formation in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19(2):99-111.

Badel, J.L., Nomura, K., Bandyopadhyay, S., Shimizu, R., Collmer, A. & He, S.Y. 2003. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 HopPtoM (CEL ORF3) is important for lesion formation but not growth in tomato and is secreted and translocated by the Hrp type III secretion system in a chaperone-dependent manner. *Molecular Microbiology*. 49(5):1239-1251.

Baltrus, D.A., Hendry, T.A. & Hockett, K.L. 2014. Ecological Genomics of *Pseudomonas syringae*. Teoksessa Gross, D.C., Lichens-Park, A. & Kole, C. (toim.): *Genomics of Plant-Associated Bacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014. Sivut: 59-77.

Biemont, C. & Vieira, C. 2006. Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*. 443(5):521-524.

Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P.F., Filloux, A. & Voulhoux, R. 2010. Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A Wealth of Pathogenic Weapons. *International Journal of Medical Microbiology*. 300(2010):534-543.

Block, A., Guo, M., Li, G., Elowsky, C., Clemente, T.E. & Alfano, J.R. 2010. The *Pseudomonas syringae* type III effector HopG1 targets mitochondria, alters plant development and suppresses plant innate immunity. *Cellular Microbiology*. 12(3):318-330.

Block, A., Toruño, T.Y., Elowsky, C.G., Zhang, C., Steinbrenner, J., Beynon, J. & Alfano, J.R. 2014. The *Pseudomonas syringae* type III effector HopD1 suppresses effector-triggered immunity, localizes to the endoplasmic reticulum, and targets the Arabidopsis transcription factor NTL9. *New Phytologist*. 201:1358-1370.

Bretz, J.R., Mock, N.M., Charity, J.C., Zeyad, S., Baker, J.C. & Hutcheson, S.W. 2003. A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defence response to infection. *Molecular Microbiology*. 49(2):389-400.

Bronstein, P.A., Marrichi, M., Cartinhour, S., Schneider, D.J. & DeLisa, M.P. 2005. Identification of a Twin-Arginine Translocation System in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and Its Contribution to Pathogenicity and Fitness. *Journal of Bacteriology*. 187(24):8450–8461.

Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Deboy, R.T., Durkin, S.A., Kolonay, J.F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M.J., Haft, D.H., Nelson, W.C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S.E., Feldblyum, T.V., D'Ascenzo, M., Deng, W-L., Ramos, A.R., Alfano, J.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., Delaney, T.P., Lazarowitz, S.G., Martin, G.B., Schneider, D.J., Tang, X., Bender, C.L., White, O., Fraser, C.M. & Alan Collmer, A. 2003. The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100(18):10181–10186.

Boureau, T., Routtu, J., Roine, E., Taira, S. & Romantschuk, M. 2002. Localization of hrpA-induced *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in infected tomato leaves. Molecular Plant Pathology. 3(6):451-460.

Bryan, M.K. 1933. Bacterial speck of tomatoes. Phytopathology 23:897–904.

Cai, R., Lewis, J., Yan, S., Liu, H., Clarke, C.R., Campanile, F., Almeida, N.F., Studholme, D.J., Lindeberg, M., Schneider, D., Zaccardelli, M., Setubal, J.C., Morales-Lizcano, N.P., Bernal, A., Coaker, G., Baker, C., Bender, C.L., Leman, S. & Vinatzer, B.A. 2011. The Plant Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Is Genetically Monomorphic and under Strong Selection to Evade Tomato Immunity. PLOS Pathogens. 7(8):e1002130.

Chang, J.H., Urbach, J.M., Law, T.F., Arnold, L.W., Hu, A., Gombar, S., Grant, S.R., Ausubel, F.M. & Dangl, J.L. 2005. A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102(7):2549-2554.

Charro, N. & Mota, L.J. 2015. Approaches targeting the type III secretion system to treat or prevent bacterial infections. Expert Opinion Drug Discovery. 10(4):373-387.

Choi, M-S., Kim, W., Lee, C. & Oh, C-S. 2013. Harpins, Multifunctional Proteins Secreted by Gram-Negative Plant-Pathogenic Bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions. 26(10):1115-1122.

Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M. & Waksman, G. 2015. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*. 13: 343-359.

Crabill, E., Karpisek, A. & Alfano, J.R. 2012. The *Pseudomonas syringae* HrpJ Protein Controls the Secretion of Type III Translocator Proteins and has a Virulence Role Inside Plant Cells. *Molecular Microbiology*. 85(2):225–238.

Cunnac, S., Lindeberg, M. & Collmer, A. 2009. *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Current Opinion in Microbiology*. 12:53-60.

Cunnac, S., Chakravarthy, S., Kvitko, B.H., Russell, A.B., Martin, G.B. & Collmer, A. 2011. Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(7):2975-2980.

DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y-B, Nomura, K. & He, S.Y. 2004. A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(26):9927-9932.

Deslandes, L. & Rivas, S. 2012. Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science*. 17(11):644-655.

Dodds, P.N. & Rathjen, J.P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews*. 11:539-548.

Dou, D. & Zhou, J-M. 2012. Phytopathogen Effectors Subverting Host Immunity: Different Foes, Similar Battleground. *Cell Host & Microbe* 12:484-495.

Dye, D.W., Bradbury, J.F., Goto, M., Hayward, A.C., Lelliott, R.A. & Schroth, M.N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev Plant Pathology*. 59(4):153–168.

Espinosa, A., Guo, M., Tam, V.C., Fu, Z.Q. & Alfano, J.R. 2003. The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Molecular Microbiology*. 49(2):377-387.

Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., Larimer, F., DiBartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., Goltsman, E., Thiel, J., Malfatti, S., Loper, J.E., Lapidus, A., Detter, J.C., Land, M., Richardson, P.M., Kyrpides, N.C., Ivanova, N. & Lindow, S.E. ym. 2005. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(31):11064-11069.

Frackman, S., Kobs, G., Simpson, D. & Storts, D. 1998. Betaine and DMSO: Enhancing agents for PCR. *Promega Notes*. 65:27-30.

Gallagher, L.A., Ramage, E., Patrapuvich, R., Weiss, E., Brittnacher, M. & Manoil, C. 2013. Sequence-Defined Transposon Mutant Library of *Burkholderia thailandensis*. *MBio*. 4(6):e00604-13.

Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F. & Grimont, P.A.D. 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systemic Bacteriology*. 49:469-478.

Gerlach, R.G. & Hensel, M. 2007. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 297:401-415.

Godfrey, S.A. & Marshall, J.W. 2002. Identification of cold-tolerant *Pseudomonas viridiflava* and *P. marginalis* causing severe carrot postharvest bacterial soft rot during refrigerated export from New Zealand. *Plant Pathology*. 51:155-162.

Goryshin, I.Y., Jendrisak, J., Hoffman, L.M., Meis, R. & Reznikoff, W.S. 2000. Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nature*. 18:97-100.

Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M. & Dangel, J.L. 2006. Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 60:425-449.

Guo, M., Tian, F, Wamboldt, Y. & Alfano, J.R. 2009. The Majority of the Type III Effector Inventory of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Can Suppress Plant Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22(9):1069-1080.

Guo, M., Kim, P., Li, G., Elowsky, C.G. & Alfano, J.R. 2016. A Bacterial Effector Co-opts Calmodulin to Target the Plant Microtubule Network. *Cell Host & Microbe*. 19:67-78.

Haapa, S., Taira, S., Heikkinen, E. & Savilahti, H. 1999a. An efficient and accurate integration of mini-Mu transposons *in vitro*: a general methodology for functional genetic analysis and molecular biology applications. *Nucleic Acids Research*. 27(13):2777-2784.

Haapa, S., Suomalainen, S., Eerikäinen, S., Airaksinen, M., Paulin, L. & Savilahti, H. 1999b. An efficient DNA sequencing strategy based on the bacteriophage Mu *in vitro* DNA transposition reaction. *Genome Research*. 9:308-315.

Haapalainen, M., Mosorin, H., Dorati, F., Wu, R-F., Roine, E., Taira, S., Nissinen, R., Mattinen, L., Jackson, R., Pirhonen, M. & Lin, N-C. 2012. Hcp2, a Secreted Protein of the Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000, Is Required for Fitness for Competition against Bacteria and Yeasts. *Journal of Bacteriology*. 194(18):4810-4822.

Haapa-Paananen, S., Rita, H. & Savilahti, H. 2002. DNA Transposition of Bacteriophage Mu. A quantitative analysis of target site selection *in vitro*. *Journal of biological Chemistry*. 277(4):2843-2851.

Harshey, R.M. 2014. Transposable phage Mu. *Microbiology Spectrum* 2(5):MDNA3-0007-2014.

Harvey, D. 2000. Modern analytical chemistry. Mc Graw Hill. Sivut 315.

He, S.Y. 1997. Hrp-controlled interkingdom protein transport: Learning from flagellar assembly? Trends in Microbiology. 5(12):489-495.

Hirano, S.S. & Upper, C.D. 2000. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64(3):624-653.

Hood, R.D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M.A., Trinidad, R.R.S, Silverman, J.M., Ohlson, B.B., Hicks, K.G., Plemel, R.L., Li. M., Schwarz. S., Wang, W.Y., Merz, A.J., Goodlett, D.R., Mougous, J.D. 2010. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. Cell Host & Microbe. 7(1):25-37.

Ichinose, Y., Taguchi, F. & Mukaiharu, T. 2013. Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae*. Journal of Genetic Plant Pathology. 79:285–296.

Izoré, T., Job, V. & Dessen, A. 2011. Biogenesis, Regulation, and Targeting of the Type III Secretion System. Cell Press. Structure. 19(5):603-612.

Jamir, Y., Guo, M., Oh, H-S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S., Tang, X., Dickman, M.B., Collmer, A. & Alfano, J.R. 2004. Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. The Plant Journal 37:554-565.

Ji, H. & Dong, H. 2015. Key steps in type III secretion system (T3SS) towards translocon assembly with potential sensor at plant plasma membrane. Molecular Plant Pathology. 16(7): 762–773.

Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., DeBoy, R., Durkin, S.A., Giglio, M.G., Madupu, R., Nelson, W.C., Rosovitz, M.J., Sullivan, S., Crabtree, J., Creasy, T., Davidsen, T., Haft, D.H., Zafar, N., Zhou, L., Halpin, R., Holley, T., Khouri, H., Feldblyum, T., White, O., Fraser, C.M., Chatterjee, A.K., Cartinhour, S., Schneider, D.J., Mansfield, J., Collmer, A. & Buell, R.C. 2005. Whole-Genome Sequence Analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A Reveals Divergence among Pathovars in Genes Involved in Virulence and Transposition. Journal of Bacteriology. 187(18):6488-6498.

Jones, A.M. & Wildermuth, M.C. 2011. The Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Has Three High-Affinity Iron-Scavenging Systems Functional under Iron Limitation Conditions but Dispensable for Pathogenesis. *Journal of Bacteriology*.193(11):2767-2775.

Jones, A.M., Lindow, S.E. & Wildermuth, M.C. 2007. Salicylic Acid, Yersiniabactin, and Pyoverdinin Production by the Model Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: Synthesis, Regulation, and Impact on Tomato and *Arabidopsis* Host Plants. *Journal of Bacteriology*. 189(19):6773-6786.

Katagiri, F., Thilmony, R. & He, S.Y. 2002. The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. Teoksessa *The Arabidopsis Book* 1: e0039. doi:10.1199/tab.0039. The American Society of Plant Biologists. Pages 1-35.

King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.

Kvitko, B.H., Ramos, A.R., Morello, J.E., Oh, H-S. & Collmer, A. 2007. Identification of Harpins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, Which Are Functionally Similar to HrpK1 in Promoting Translocation of Type III Secretion System Effectors. *Journal of Bacteriology*. 189(22):8059-8072.

Kvitko, B.H., Park, D.H., Velasquez, A.C., Wei, C-F., Russell, A.B., Martin, G.B., Schneider, D.J. & Collmer, A. 2009. Deletions in the Repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Type III Secretion Effector Genes Reveal Functional Overlap among Effectors. *PLoS Pathogens* 5(4): e1000388.

Lamberg, A., Nieminen, S., Qiao, M. & Savilahti, H. 2002. Efficient insertion mutagenesis strategy for bacterial genomes involving electroporation of in vitro-assembled DNA transposition complexes of bacteriophage Mu. *Applied and environmental microbiology*. 68(2):705-712.

Lanckriet, A., Timbermont, L., Happonen, L.J., Pajunen, M.I., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Savilahti, H. & Van Immerseel, F. 2009. Generation of single-copy transposon insertions in *Clostridium perfringens* by electroporation of phage Mu DNA transposition complexes. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(9):2638-2642.

Liberati, N.T., Urbach, J.M., Miyata, S., Lee, D.G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T. & Ausubel, F.M. 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(8):2833-2838.

Lin, N-C. & Martin, G.B. 2005. An *avrPto/avrPtoB* Mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Does Not Elicit Pto-Mediated Resistance and Is Less Virulent on Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18(1):43-51.

Lindeberg, M., Cunnac, S. & Collmer, A. 2009. The evolution of *Pseudomonas syringae* host specificity and type III effector repertoires.

Lindeberg, M., Stavrinides, J., Chang, J.H., Alfano, J.R., Collmer, A., Dangl, J.L., Greenberg, J.T., Mansfield, J.W. & Guttman, D.S. 2005. Proposed Guidelines for a Unified Nomenclature and Phylogenetic Analysis of Type III Hop Effector Proteins in the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)*. 18(4):275-282.

Lozano-Durán, R., Bourdais, G., He, S.Y. & Robatzek, S. 2014. The bacterial effector HopM1 suppresses PAMP-triggered oxidative burst and stomatal immunity. *New Phytologist*. 202:259-269.

Lorang, J.M. & Keen, N.T. 1995. Characterization of *avrE* from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: A *hrp*-linked avirulence locus consisting of at least two transcriptional units. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8(1):49-57.

Macho, A.P. & Zipfel, C. 2015. Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Current Opinion in Microbiology*. 23:14-22.

- Macho, A.P., Schwessinger, B., Ntoukakis, V., Brutus, A., Segonzac, C., Roy, S., Kadota, Y., Oh, M-H., Sklenar, J., Derbyshire, P., Lozano-Duran, R., Malinovsky, F.G., Monaghan, J., Menke, F.L., Huber, S.C., He, S.Y. & Zipfel, C. 2014. A bacterial tyrosine phosphatase inhibits plant pattern recognition receptor activation. *Science*. 343:1509-1512.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G. & Foster, G.D. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13(6):614-629.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. & He, S.Y. 2006. Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell*. 126:969-980.
- Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J-M. & Cornelis, G. 1990. Secretion of Yop Proteins by *Yersiniae*. *Infection and Immunity*. 58(9):2840-2849.
- Morris, C.E., Sands, D.C., Vinatzer, B.A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffiere, A., Yan, S., Dominguez, H. & Thompson, B.M. 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The International Society for Microbial Ecology Journal*. 2:321-334.
- Müller, S.A., Pozidis, C., Stone, R., Meesters, C., Chami, M., Engel, A., Economou, A. & Stahlberg, H. 2006. Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. *Molecular Microbiology*. 61(1):119-125.
- Munkvold, K.R., Martin, M.E., Bronstein, P.A. & Collmer, A. 2008. A survey of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion system effector repertoire reveals several effectors that are deleterious when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21(4):490-502.
- Nomura, K., Mecey, C., Lee, Y-N., Imboden, L.A., Chang, J.H. & He, S.Y. 2011. Effector-triggered immunity blocks pathogen degradation of an immunity-associated vesicle traffic regulator in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(26):10774-10779.

Nomura, K., DebRoy, S., Lee, Y.H., Pumplin, N., Jones, J. & He, S.Y. 2006. A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science*. 313:220-223.

O'Brien, H.E., Thakur, S. & Guttman, D.S. 2011. Evolution of Plant Pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: A Genomics Perspective. *Annual Review of Phytopathology*. 49:269-289.

Paatero, A.O., Turakainen, H., Happonen, L.J., Olsson, C., Palomäki, T., Pajunen, M.I., Meng, X., Otonkoski, T., Tuuri, T., Berry, C., Malani, N., Frilander, M.J., Bushman, F.D. & Savilahti, H. 2008. Bacteriophage Mu integration in yeast and mammalian genomes. *Nucleic Acids Research*. 36(22):1-13.

Pajunen, M.I., Pulliainen, A.T., Finne, J. & Savilahti, H. 2005. Generation of transposon insertion mutant libraries for Gram-positive bacteria by electroporation of phage Mu DNA transposition complexes. *Microbiology*. 151:1209-1218.

Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., Schechter, L.M., Janes, M.D., Buell, R.C., Tang, X., Collmer, A. & Alfano, J.R. 2002. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(11):7652-7657.

Poussu, E., Jäntti, J. & Savilahti, H. 2005. A gene truncation strategy generating N- and C-terminal deletion variants of proteins for functional studies: mapping of the Sec1p binding domain in yeast Mso1p by a Mu *in vitro* transposition-based approach. *Nucleic Acids Research*. 33(12):1-8.

PPI *Pst* DC3000 –kotisivut – pseudomonas-syringae.org. Viitattu 1.2.2018.

<URL: http://www.pseudomonas-syringae.org/pst_home.html>.

Preston, G.M. 2000. Pathogen profile: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Molecular Plant Pathology*. 1(5):263-275.

Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F. & Mekalanos, J.J. 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(5):1528-1533.

Rodríguez-Herva, J.J., González-Melendi, P., Cuartas-Lanza, R., Antúnez-Lamas, M., Río-Alvarez, I., Li, Z., López-Torrejón, G., Díaz, I., del Pozo, J.C., Chakravarthy, S., Collmer, A., Rodríguez-Palenzuela, P. & López-Solanilla, E. 2012. A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cellular Microbiology*. 14(5):669-681.

Rodríguez-Palenzuela, P., Matas, I.M., Murillo, J., López-Solanilla, E., Bardaji, L., Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Mosquera, M.E., Penyalver, R., López, M.M., Quesada, J.M., Biehl, B.S., Perna, N.T., Glasner, J.D., Cabot, E.L., Neeno-Eckwall, E. & Ramos, C. 2010. Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. *Environmental Microbiology*. 12(6):1604-1620.

Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. & He, S.Y. 1997. Hrp pilus: An *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:3459-3464.

Savilahti, H., Rice, A.P. & Mizuuchi, K. 1995. The phage Mu transpososome core: DNA requirements for assembly and function. *EMBO Journal* 14(19):4893-4903.

Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3. painos. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Stavrínides, J., McCloskey, J.K. & Ochman, H. 2009. Pea Aphid as both Host and Vector for the Phytopathogenic Bacterium *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(7):2230-2235.

Underwood, W., Zhang, S. & He, S.Y. 2007. The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal. 52:658-672.

VandenDriessche, T., Ivics, Z., Izsvak, Z. & Chuah, M.K. 2009. Emerging potential of transposons for gene therapy and generation of induced pluripotent stem cells. Blood. 114(8):1461-1468.

Vinatzer, B.A. & Monteil, C.L. 2014. *Pseudomonas syringae* Genomics: From Comparative Genomics of Individual Crop Pathogen Strains Toward Population Genomics. Teoksessa Gross, D.C., Lichens-Park, A. & Kole, C. (toim.): *Genomics of Plant-Associated Bacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014. Sivut: 79-98.

Wei, C-F., Kvitko, B.H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J.R., Lin, N-C., Martin, G.B., Huang, H-C. & Collmer, A. 2007. A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. The Plant Journal. 51:32-46.

Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A. & Beer, S.V. 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science 257(5066):85-88.

Wroblewski, T., Caldwell, K.S., Piskurewicz, U., Cavanaugh, K.A., Xu, H., Kozik, A., Ochoa, O., McHale, L.K., Lahre, K., Jelenska, J., Castillo, J.A., Blumenthal, D., Vinatzer, B.A., Greenberg, J.T. & Michelmore, R.W. 2009. Comparative Large-Scale Analysis of Interactions between Several Crop Species and the Effector Repertoires from Multiple Pathovars of *Pseudomonas* and *Ralstonia*. Plant Physiology. 150:1733-1749.

Xin, X-F. & He, S.Y. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. Annual Review of Phytopathology. 51: 473-498.

11 LIITTEET

LIITE 1. Kukka-transposonin (KTn) sekvenssi ja siihen sitoutuvat alukkeet

AGATCTGAAGCGGCGCACGAAAAACGCGAAAGCGTTTCACGATAAATGCG
AAAACGGATCGCGGCCGCTGATCATCTAGAGAATTCTACCGTTCGTATAGC
ATACATTATACGAAGTTATGGTACCGATATCGGGATCTATCCTAGTAAGCCA
CGTTGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATATCA
TCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTT
ATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCCTGCTCGAGGCCGCGATTAAATTCCA
ACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGC
AATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGT
TGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGA
TGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCA
TTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGG
AAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATT
GTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTCCTGTTTGTA
ATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACG
AATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGG
CTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCATTCTCA
CCGATTTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGA
CGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGA
CCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCT
TCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGA
ATAAATTGCAGTTTCATTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTT
AATTGGTTGTAACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGGC
TTTGTGTAATAAAT[CGAACTTTATTCGGTCGAAAAGG]GGATCGATCGGTAC
CGATATCATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAACGGTACTAGCTAGGAT
CCGTTTTTCGATTTATCGTGAAACGCTTTCGC GTTTTTCGTGCGCCGCTTCAG
ATCT

H8425-5 (Fwd) (=KTn Km^R -geenin ylävirran aluke ja ulkopuolen aluke nested-PCR)
5'-GGGTGTTATGAGCCATATTCAAC-3'

H8425-6(Rev) (=KTn Km^R -geenin alavirran aluke ja ulkopuolen aluke nested-PCR)
5'-CTGATTAGAAAACTCATCGAGCA-3'

Mu-end-primer (=Mu-alueen sekvenssi ja sisäpuolen aluke nested-PCR)
5'-GTTTTTCGTGCGCCGCTTCA-3'

KA 1608 (=KTn Km^R -geenin sekvenssin alkupää (262) ja sekvensointialuke)
5'-CAAGACGTTTCCCGTTGAATATGG-3'

KA 1408 (=KTn Km^R -geenin sekvenssin loppupää (1063) ja sekvensointialuke)
5'-GCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAG-3'

AGATCT = *Bg/III*-restriktioentsyymien sitoutumiskohdat

LIITE 2. MuA-transposiitokompleksin valmistusohje

From plasmid prep to MuA-complexes

Isolation of plasmid-DNA

Isolate your plasmid containing the desired transposon. You should have approximately 1000 µg of your purified plasmid (or more), preferably at a concentration around 1000 ng/µl.

Digestion of plasmid-DNA

Digest the plasmid containing the desired transposon.

- 80-100 µg of the plasmid / 400 µl digestion volume (i.e. DNA concentration in digestion is around 200-250 ng/µl)
- 3-5 U/µg of DNA of your enzyme that cuts at the transposon ends (e.g. *BglII*)
- digest o/n (over night) at 37°C
- NB! Prepare several 400 µl digestions. You will lose approximately ¼ of your DNA during phenol & chloroform extraction and subsequent precipitation, and depending on your plasmid another ½ during HPLC-purification and subsequent DNA precipitation.

Run a small aliquot of all your digestions (e.g. 1 µl) in an agarose gel to make sure that the digestion is complete. If the digestion is not complete, add approximately 1-2 U of enzyme / µg of DNA and continue the digestion for several hours at 37°C. Run another agarose gel of your digestions to make sure that the digestion is complete.

Extract DNA-digestion with phenol

- Add 1 volume of phenol to your DNA-digestion
- Mix for 30 min – 1 hour in "carousel" or equal
- Spin for 10 min RT (room temperature) 13 000 rpm in a micro centrifuge
- Take upper phase (contains DNA) into a fresh eppendorf-tube
- Repeat phenol extraction

Extract DNA-digestion with chloroform

- Add 1.5 volumes of chloroform to your DNA-digestion
- Mix for 30 min – 1 hour in "carousel" or equal
- Spin for 10 min RT (room temperature) 13 000 rpm in a micro centrifuge
- Take upper phase (contains DNA) into a fresh eppendorf-tube
- Repeat chloroform extraction

DNA-precipitation

- Precipitate DNA with 1/10 of sample volume of 3 M NaAc pH 7.0 and 2.5 sample volumes of 100 % EtOH
- Precipitate at -80 °C for 30 min
- Centrifuge for 45-60 min +4 °C 13 000 rpm in a micro centrifuge
- Discard supernatant carefully without disturbing the pellet
- Wash DNA-pellet with 100 µl of 70 % EtOH
- Spin for 10 min +4 °C 13 000 rpm in a micro centrifuge
- Discard supernatant carefully without disturbing the pellet
- Let DNA-pellet air dry
- Resuspend pellet in TEN (e.g. 100 µl)
- Let DNA dissolve over night at +4 °C
- Pool your DNA-samples into one

TEN 10 mM Tris pH 7.5
0.5 mM EDTA
50 mM NaCl

Determining the DNA-concentration

- Dilute your DNA-sample
- Always use the same buffer as the reference buffer and for diluting the samples as is used for resuspending the sample. Eg. do not dilute with water if the DNA is suspended in TEN.
- If the absorbance is over 0.9 the sample must be diluted more. The aim is to get an absorbance between 0.2 – 0.9. Absorbance 0.1 – 0.2 is good if the DNA is extremely clean. Below 0.1 the result is not reliable but needs to be considered with caution.

Suggested dilutions (1:20 = 3 µL of DNA + 57 µL of buffer)
 1:50 = 2 µL of DNA + 98 µL of buffer
 1:80 = 2 µL of DNA + 158 µL of buffer

Purifying the transposon by HPLC

Purify the transposon fragment with SMART-system (Pharmacia) using either Waters, TosoHaas, or MonoQ column. Usually you can purify 30-50 µg in one run.

E.g. for *Bgl*II digested pLEB620 use MonoQ HR 5/5 column (Pharmacia)
Run: 72-82 % B in 60 min, 450 µl/min, fractions à 150 µl. Collect fractions of desired peak.

Buffer A 25 mM Tris-HCl pH 8.0
 1 mM EDTA pH 8.0

Buffer B 25 mM Tris-HCl pH 8.0
 1 mM EDTA pH 8.0
 1 M NaCl

- Analyze the collected fractions in an agarose gel. For fractions of 150 μ l analyze 0.5 – 2 μ l
- Pool and precipitate the desired fractions by adding 2.5 vol. EtOH (no need to add salt, since the DNA is eluted with NaCl)
- Precipitate at -80 °C for 60 min
- Centrifuge for 60 min +4 °C 13 000 rpm in a micro centrifuge
- Discard supernatant carefully without disturbing the pellet
- Wash DNA-pellet with 100 μ l of 70 % EtOH
- Spin for 20 min +4 °C 13 000 rpm in a micro centrifuge
- Discard supernatant carefully without disturbing the pellet
- Let DNA-pellet air dry
- Resuspend pellet in TEN (e.g. 20 μ l)
- Let DNA dissolve over night at +4 °C
- Pool your DNA-samples into one
- Determine the concentration

Assembly of transposon complexes

Basic reaction in 20 μ l, can be scaled up to 80 μ l reaction volume. Do 8 x 80 μ l reactions.

- Dilute the MuA in final concentration of 400 ng/ μ l with cold MuA dilution buffer. Keep MuA on ice all the time. Pipet MuA up and down before taking an aliquot or adding into the reaction as it is a sticky protein.
- Mix sterile H₂O, sterile glycerol, and 5 x complex buffer at RT (room temperature), and transfer the tube on ice
- Add your donor DNA. 1.1 pmol / 20 μ l reaction, 4.4 pmol / 80 μ l reaction
- Transfer tubes directly into 30°C after adding MuA. Mix thoroughly!
- Incubate in the 30°C water bath for 4 h

x μ l	H ₂ O (add until final reaction volume is 80 μ l)
40 μ l	glycerol (BDH) (50 % in final reaction)
16 μ l	5 x complex buffer (1 x in final reaction)-
x μ l	donor transposon (4.4 pmol)
4 μ l	MuA 400 ng/ μ l (400 ng of MuA / 1.1 pmol of transposon)
Σ	80 μ l

MuA dilution buffer

Buffer		In the reaction
300 mM	NaCl	15 mM
25 mM	Hepes pH 7.6	1.25 mM
0.1 mM	EDTA pH8	0.005 mM
1 mM	DTT	0.05 mM
10 % (w/v)	glycerol	0.5 %

5 x complex buffer

5 x buffer		In the reaction
750 mM	Tris pH 6	150 mM
0.125 %	Triton TX-100	0.025 %
750 mM	NaCl	150 mM
0.5 mM	EDTA	0.1 mM

Concentrating your complexes

- Pool your 8 x 80 µl reactions = 640 µl
- (Optional: take sample for gel)
- Add 380 µl of sterile filtered 20 % (w/v) PEG 6000 – 2.5 M NaCl. NB! Prepare a new solution each time you concentrate your complexes.
- Precipitate on ice for 60 min
- (Optional: take sample for gel)
- Centrifuge for 60 min +4 °C 13 000 rpm in a micro centrifuge
- Discard supernatant carefully without disturbing the pellet
- Dissolve pellet in 50 µl of 10 mM Tris-HCl, pH 6.0, 0.5 % glycerol, 0.1 mM DTT
- Dissolve the pellet on ice for 60 min or o/n. Tap the tube to help the pellet dissolve

Transposon complex gel

2 % NuSieve 3:1 in 1 x TAE, heparin 87 µg/ml, BSA (bovine serum albumin) 87 µg/ml

- Measure 1 g of NuSieve 3:1 agarose in an Erlenmeyer.
- Add 49 ml of H₂O. (Weigh gel; should be approx. 49 g)
- Melt in the microwave oven.
- Weigh gel again, and add H₂O so that final weight is 49 g
- Add 1 ml of 50 x TAE.
- When about 55°C, add 43.5 µl of heparin 100 mg/ml and 109 µl of BSA 40 mg/ml.
- Prepare gel samples. For the Stop, mix 2/3 vol. 25 % Ficoll 400 (1 µl) and 1/3 vol. 65 mg/ml heparin (0.5 µl).

5 µl non-concentrated complexes
1.5 µl Stop

0.5 – 1.0 µl concentrated complexes
5 µl H₂O
1.5 µl Stop

- Run the gel at 80 V (5 V/cm) for 1-2 h depending on the size of the transposon (for 2 kb 2 h). Circulate the buffer with a pump.

- Stain the gel with EtBr 0.5 µg/ml in 1 x TAE for 60 min. Staining can be prolonged up to o/n if needed.
- (Optional: Destain the gel in TAE or H₂O for 20 min.)

1 x TAE 40 mM Tris-acetate
 1 mM EDTA

LIITE 3. *Pst* DC3000 -bakteerin *hopD1*, *hopA01* ja *hopM1*-geenien sekvenssit sekä niihin suunnitellut alukkeet ja K_{Tn}-transposonin insertiokohta sekvenssissä

HopD1-geeni (PSPTO_0876; 5'- 946 222 – 948 339 -3') koko 2117 bp (300 bp ylävirtaan lisää sekvenssiä)

>gi|28867243:945922-948339 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str. DC3000, complete genome

TTTTCGGCTCAGATTAAGTGCAGCTGACGCAGCCCTCTGGCTC**TCACATTAGTTGCGAGCGAG**CTTGCAATTC **HopD1out-F**
AACTGCCTCTGCTTGCAATTACATCGCTGGCAATCACATTAGCTGCGAGTGAATATGAGCGGGGAGATT
GGCAAATCCGCCGCGAGCATTTTCGTGCGCGAGTGTGTCCATGTCAGTGGTGTGCTTCCCGCTCGACGCAT
TCGCCGGTTTTGAGTCTGTCTTTGGAACCAAGAGCCCTTGCAGCCACACATTGGATCCGATTACTTCAT
CCGGGACAGCTGATAGCGCT**ATGAATCCTCTACGATCTATTCAACACAACA**TTGCAACTCCCCCAATCAG **HopD1-F**
TGGCGGTGAGCCATTAGACGCGGTGGGCCCTCAGGCCAGCAATCCCATCCTAAAAGGATTTACCTTCT
CAATTGAGCCAAAGCGCTCACCAGGCTCTAGAAGCGCTTTTCAGCTAATGCCGAACACCAACGCTTGCAAT
CACTGGTACGCAACGCTCTGCAGGATGGCACATTTCAATTTCAATCCAGTAACACACGCAAGTAACCTA
TAAAGCGTCAATCTGTCTGCCAGCTGACACCGATACCGTGAGAACCGACCACTTGATTAATAACGAGCTG
ACGGTTACAGGCCGATTAATGATCAATCGGAGTACGACATCGTCAGCGCACATTTGCATGGCTCTTCGA
AAGCCATATCCTTCGACGTACCCAGCCCCCGCCGCGACATGGTTCAGCATCTTCTGTCTTGAGTGAACG
GACCCATCTAGGTATGAGTTCGCGTTCTCTCACAAGATGCAGTAGACAGCAGTAGCCTGGAACTCCGTTA
CTGAGCTCGCCAGACCATCTCTCGTCCGCCATCAGACCCAAAGCCCGTGCATATCGGGTCCGTCAGGG
ACTCTGGTAGCCTTGTTCGATAACCCGGTAGTGCAGGCCCTGCTATCGTTTGGCGAGGCCGACAGGC
ATTTCCACCACAGGCCGCGAGCATTTGCCGGGTCCAGCTGGAATGCGGCCACGTCGGGATATTGAGAAA
GCACTTGAGGAATTCAAAGGCGCCTTCACGGTGGTGAAGGCGCAACTGATGTCCGGTGCCAACTCGTCGG
AGCGTGTAGATGAGGATGTCAACGCAGACATCCATATCCCTTATTGCTCAAGGCCATCGAGCGGGGGG
TGCGGCATTTGGTCCAAACGCATCAATCGGCCAGAATAGCGCGAAAGCGTTTCTCGCTCATGTGCTCCC
AAGATCACGTCCAATGACGATGTCTCTCCGAGTTCATCAACCAGAACTCAAGGGGGACGACGATCTTC
AGGTTCCGCTGGGCGCACAGGAATTGTTGCATGTAGCCACCAAGAAGGAATTCAGCTCGCGGTCTAGC
CGGCAGCATCGGGGTGACGAGCATCTCGGCTCGGCATGGGAGCTTGGCGCTTCTGAGCTGTGA#AAAAT
GCCATCTTCGGCAAAAATTTCTCACCGAGCCAATATGCCCTGCAATTGGCTGGAATCGATTCAAGTGCCTC
CTTTGATTATCGAGTCCATGGACACCATGTGCGTACTTGCCATCATCAAGGGCATGAAGGGTGAGGAGTG
GTCCATGAGCGATCTACTTCCCAAGCGTTGAAGCGCGGTGCTATTTCTCGGTGGTGTCAATCCCCAAT
AATGTTTTGCAGTATGCAGGTTTCAAATCCAGAGTCGGCGATCTTGCGGCAAACTCAGTGACAACTGAAG
CGGCCATCTTTGGCGCCGCTCCGGTATTCCACCCGAGGTCAAGGAAAGTGAAGAGCTGATGCGTGCTGG
CTTATTCAGAGCATGAAGGACGGCTGATGGCTCATTACGGCGAGGGGGTGGACACCAAAAAACGATT
GAGCGGATGACGCGCATGCGCTGGATATCGCTCCGGGCGAAAGCACCGCTGTCAAGTCCATGGGGCTGG
CATCGATTGTGCGGATGATTCCACTGATTGCCAGCAACAAGGCAACCGGGCTGCTGTGCGAACAGGTACT
GCGTATTTTCCGAGAGCGCGTCTTCAATCCAATCGAAGCCATCGCTCTGAACGCGTTGGCGCTTGGCGGG
CGTGTCAACGTTCCCGGGCTATTTGATTCCGACAATGCCAAGCATGCACGCGTGGTACAAACCATCCTTG
CGCGGGCCAGCCAGCACATGGAAGCTGGAGACCGTGACATTTCCGCAGAGGAGCTACATCAAATGCTGGC
TCCCGGAGCGAGTTCTGCGCCATGTGGGATCTGCGATTGTCAACGGCATGAATGCCAGCTTTGAGGCA
ATTCGCCCGCTGGTTCGGAAGCTTGATATGGTGAGGCTCCATTGGCCGAAC**CGTATTCCGTATCAAGACC** **HopD1-R**
TGGCTGTGCCCGACAGCTCGCGGCAGCCCGCACCTGA

K_{Tn}-transposoni-insertion kohta merkitty sekvenssiin #

HopD1 out-Fwd (=ulkopuolen aluke nested-PCR)

5'- TCACATTAGTTGCGAGCGAG -3' (20 bp) T_m=64,5 °C

HopD1-Fwd (=sisäpuolen aluke nested-PCR ja *hopD1*-geenin ylävirran aluke)

5'- ATGAATCCTCTACGATCTATTCAACACAACA -3' (31 bp) T_m=68,7°C

HopD1-Rev (= *hopD1*-geenin alavirran aluke)

5'- ACAGCCAGGTCTTGATACGGAATACG -3' (26 bp) T_m=70,5°C

HopAO1-geeni (PSPTO_4722; 534 7118 – 534 8524) koko 1407 bp

>gi|28867243:c5348724-5347118 Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000, complete genome

GCTCGATCTCAGGGCGCGAAAAGCTCCCTCTCCTAGTGGCCAAGCCCGCCTTGTGGCGGGCTTGGTGGTG
CAGCGGTTTTTCCGTTTTCTCTGTTGTCGTCTTGAATCTGTCTTCGGAACCCACAAAGCACTTATGACCA
CGCATTAGGATCCAATGCCTTTTCGTACGCCAATTAC**CTCAACCGAGATAGTTCATACAGCTATGAATCCCC** out-F
TGCAACCTATTCAGCACAGCATTACAAATTCCCAAATGAGTGGTGGTCAGCAATTAGAGGCGGAGGGCTC **HopAO1-F**
TCAGGCCCACAATTCTATTCCCATCTGACAGGATTTCGCTTTCCCAATTGAGCCAAAGCGCTCACCTA
GCTCTAGATCACCTTTCAACTCAGCCTAATACCGATCACCAACGCGTTGCATCACTGGTACGCAACGCTG
TGCAGGACGGTAAGTTCCAACCTCAATCCAGTAACGACACGCAAGTAACCTATAAACTTCAGTCTGTCC
GCCAGCTAACGCCGACACCATGGGGGCCGCCACTTAATTAATAACGAGCTGACGGTTCAGGCCCGATTA
AATGATCAACTTGAGTACGACATCGTCAGCGCTCATTGTATGGCCCTTCGGAAGCCATATCCATCGATG
CATCCAGTCTCCTCCCTCGGCCAACGATCTAGCGTCCCTCTGGCTTGAGCGAACGTACGCATCTAGGTATGAA
TCGTGTCTCTTACGCTACGCGGTGCCCCCTCGGGAACCGAAGACCAATGTGTTATGGTGATCGACAAA
ATGCCCCCCCCCAAACACGGCAAAATGTCTTTCTTCCGTACCACTAATGACTTGAGCAAACCTGCCTTTGG
GAATGGAGACGGGCGGGTGTCCGACCTGAAATTGGCTGGTTGTGAACGTATTTCTCCGTCGAGCAGGT
GAAGAGTATCCGCGCAGCGCTTGGAGGCGGGCCGCTCACCGTACTAGATCTGCGCGAAGAATCTCATGCG
ATTGTCAACGGTTTGCCTATCACCTTACGTGGCCCGATGGATTGGGCCAACGCCGGCCTATCCCAGGTG
ACGGAGCGGCACGTGAAAGTGCCATGATTACAGAAGTGAAGCGCACTAAGTCTTTAACGTTGGTCGATGC
CAATTATGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGTATCCTCAAACGACAGAACTGAAAAATTTGAATGTCCGGAGCGAG
CGAGAAGTCGTTACAGAGGCCGGC#GCGACCTATCGCCGCGTGGCCATTACCGACCATAACAGGCCTAGTC
CGGAAGCGACCGACGAGCTAGTAGACATCATGCGCCACTGCCTGCAGGCAAATGAGTCGCTAGTTGTGCA
CTGTAACGGCGGTTCGGGGCCGTACTACCACGGCTATGATAATGGTCGACATGCTTAAGAACGCTCGTAAC
CATTCCGCAGAAACCCTCATCACGCGTATGGCCAAGCTAAGCTATGACTACAACATGACGGATCTAGGCA
GCATTTCTGCACCTCAAGCGGCCATTCTAGAGGACAGACTAAAATTTCTGCAGGCCTTTCACGACTATGC
CCGCAACAACCAAGCGGATTATCTCTTAATTGGACACAGTGG**CGCGCAAAATAGCGTTAGAA**TGA **HopAO1-R**

KTn-transposoni-insertion kohta merkitty sekvenssiin #

HopAO1out-Fwd (=ulkopuolen aluke nested-PCR)

5'-CTCAACCGAGATAGTTCATACA-3' (22 bp) $T_m = 58,9^\circ\text{C}$

HopAO1-Fwd (*EcoRV*) (=sisäpuolen aluke nested-PCR

ja *hopAO1*-geenin ylävirran aluke)

5'-ACAGATATC ATGAATCCCCTGCAACCTATTCA-3' (30 bp) $T_m = 67,5^\circ\text{C}$

HopAO1-Rev (*EcoRV*) (=hopAO1-geenin alavirran aluke)

5'-TGTGATATC TTCTAACGCTATTTTTTGCGCG-3' (29 bp) $T_m = 66,1^\circ\text{C}$

HopM1-geeni (PSPTO_1375; 151 1461 - 151 3599) koko 2138 bp

HopM1-geeni (reverse -muodossa)

>gi|28867243:c1513599-1511461 Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000, complete genome

TTA**ACGCGGGTCAAGCAAGCCCTCTTCAAGTGC**CTCAATGCGTCATCGTCTTTTGTGCGGTGCTTAAGC **out-Rev/Rev**
GCCTCGGTGCTGACGCGACTGCGTTCAACACACCTTCATCCACGACCCGAACCGTATCCACGGCCATCT
GGGTAGGCAACTGCAATGCGCCTCGTCCCATGTGATAGGCGTTTTCCG**CGACTCGTGGGATAACCGCTCAA** **in-Rev**
CGTGCTCTTCTGGAACGTATGTGGCAGAGACTCCCTGTTGCGATGACGGATGTTATTCAAAGCCGTCTCG **(-188 bp)**
GTACGGTCCAGCATAGGTGTTGCACCGCCCATGCGTGGCGCTTTCAACGCCCTGGCTTCTGCGGTAACCG
ACTGGTTGGTGATACAACGTGGACAGATAGGACACCGAACCCTCGCTGCCAGGGCCATGTTGCGCAAAAT
AGCCCCCGCACTGAGCGTGCCACTTGCGCCTTCAGCCTGAGCGGTACAGGCGGCAGTGCCGAGGTGAGT
GCAGAACTCTGAATACCCGAA**#**AGAGCCTTGCTGTAGAACGTGGTGCGTACCGACGGCTCGCGCAGGTCCA
TACCTTTGAGCAGGTCTTTTTTCAGATCGCTCTCGGCGCGGTCCGGGGTAAATACCGGAATTTTTCGCGCC
TTGCGGGTCGACATAATTTCGACTTCAATTGCAGCAGCGTTTGCGAACTGGCAGACACCGCCCCGCCAAAA
CCGGATGCCAGAGCTCTTGCACTCAGCGCTGCCCCATTGATCTGGTGAACATCGTTGAGCATCTGGCGCA
CAGCCTGAGAACCACCGAAGGCACCTGTAAGCCATCAGCTCACCTACCGGATGGGTGGACGAACCTGAAC
CTTCTTCTGGTTGAGCAGCGCGCTTCACTTTTTCACGAACGCCTTGCTCTGAGCGACTTCTCGGGCGTT
TTTTTGACCAGCTCACCGTGTTCGCTTTTTCAGCTCGAAGGGGTCAGGAATAACCGTATTGGTATCCACAG
CCTTCATTGGCACCATTGTTTCAGGCGTTGTTGAGGCGCAGTCTCTGCAAGCGCGCCTGAAACATCGGCTT
GACCACGCTGTTGACCGTCTCGTGAGCAATGCCCGCCACCATCCCGATTATCGAAGCCTTGAGCATGTTG
GCGTCGCTGCTGGTCTCGGGAATCGTGTCTCGCAGCTTGTGCGTGGTGACAAACGCACATAACCCAAAGT
GTGTCAATTGAAGACAAGAAGTGCAGAACCGCAGCCGCGACAAATCGGCCCTGCACCTTTCCAGCCACCCAC
CGTGTACGGGCAGTGACGAGATCGCTGACGACGTTGTCCAGTTGCGTATGTGCGGCGACCGAAGCAAGG
CGCTTGCGCTCCGGCGACTTGACGAAATCGGCGTGCAAACTACCAGGGTGGTTTTGGCGTCGACCAGCG
CCTGCCTGTCAGCGTGCAGAGACTCCTTGTTGCCCTGTTGCGCATCTTGCAAGAGTGAGATCCAGCGCACT
GATGTGCTCATCCAGCGACGCGATGCTGTTGCTCAGGCCTTCGCCGATTGCCTTGCTTGACGACCGGCG
TATTCGCAAGGGCAGTCTGACTGACGGCAAGCGTCGCCTTGTCCGCTTTTGCATGCTGGCCTACCGTTG
CGGGCGAAGCGTCATGCATCAGTTGAAAGTGCTCCAGTTGATCAGCGACCGACTGAGCAAAACCTTGAT
CAGTTGCCCGACCTCGGCTTTATCCGGTATCTGACCCGGCTGGGCGAATTTTCCAGCCGCTGCTGCAAG
TCCGAGCCCTGAAATGCTTCAGTTGATAGCGTCAAGGAGACAATTTCTCGGCCATGACTTCAAAAGGCA
AAGGCTCGGCCTGCAGCAGACTACCGATCAACACGCAGCACGCGAAGTATCATCGGCGCGCCGCTGAC
CGGAGCCGTCCCATGCTCAGCCTTGAAGGCCTGCAAAAGCTGTGTGTGTCGAGCCGCGACATTACGCCG
GCCGCGCCGGCAGACGAGCTTTCTGTGCGGTGTGACCTGACTGATCGGGAGTCAGCGCGGATTCATGC
CTGCAGTGACTGCATTTGGGTGAGCTGTCTGGGCGGGAACAGTATCGTGCTGCTGGTTTACCCGGCTGAG
TTCGACGCCACCGGCC**CCGCCGATCCGCGAAGTATCAT** **HopM1-Fwd**

KTn-transposoni-insertion kohta merkitty sekvenssiin **#**

HopM1 Nested out-Rev (=ulkopuolen aluke nested-PCR)

5'-AGC AAG CCC TCT TCA AGT GC-3' (20 bp) $T_m = 66,2^\circ\text{C}$

HopM1 in-Rev (=sisäpuolen aluke nested-PCR – geenin lopusta puuttuu 188 bp)

5'- CGACTCGTGGGATAACCGCTC -3' (20 bp) $T_m = 69,4^\circ\text{C}$

HopM1-Fwd (*hopM1*-geenin ylävirran aluke+RE site)

5'-GGA TAC C AT GGT CAG TTC GCG GAT CGG CGG-3' (30 bp) $T_m = 79,9^\circ\text{C}$

HopM1- Rev (= *hopM1*-geenin alavirran aluke+RE site)

5'- CGG TAC CAT GGT ACGCGGGTCAAGCAAGCCCT -3' (32 bp) $T_m = 74,3^\circ\text{C}$

LIITE 4. *Pst* DC3000 -bakteerin *hopD1*, *hopAO1* ja *hopM1*-mutanttien sekvensointinäytteiden tulokset ja K_{Tn}-transposoni-insertiokohta sekvenssissä

Pst* DC3000 *hopM1::K_{Tn} (K_{Tn}106_pesäke91; sekvensoitu ; sekvensointialuke KA1408)

Sample name: K_{Tn}106_91/HopM1
S1418_05_E01_009.seq

ATAGACTGGTTATTGGTTGTaACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGGCTTTGTTGAATAAATCGAAC
TTTATTCGGTCGAAAAGGGGATCGGTACCGATATCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAACGGTACTAGGATCCGT
TTTCGCATTTATCGT**GAAACGCTTTCGC****GTTTTTCGTGCGCCGCTTCA**TTCCGGGTATTCAGAGTTCTGCACTGACCTCGG
CACTGCCGCTGTGACCGCTCAGGCTGAAGGCGCAAGTGGCAGCTCAGTGCAGGGGGCTATTTTGCACAACATGGCCCTG
GCAGCGACGGGTTTCGGTGTCTATCTGTCCACGTTGTACACCAACAGTCGGTTACCGCAGAAGCCAAGGCGTTGAAAGC
GGCAGGCATGGGCGGTGCAACACCTATGCTGGACCGTACCGAGACGGCTTTGAATAACATCCGTCATCCGAACAGGGAGT
CTCTGCCACATACGTTCCAGAAGAGCACGTTGAGCGGTATCCCCACGAGTGACGGGAAGACGCCTATCACATGGGACGAG
CGCATTCAGTTGGCTTACCCAGATGGGCCGTGGAT

HopM1-geenin sekvenssi jatkuu tähän suuntaan 5'-3'-muodossa
MuEnd Primer -alukkeen sekvenssi (**GTTTTTCGTGCGCCGCTTCA**)
K_{Tn}-transposonin sekvenssi jatkuu tähän suuntaan

Pst* DC3000 *hopAO1::K_{Tn} (K_{Tn}70_pesäke9; sekvensoitu ; sekvensointialuke KA1608)

S1409_08_H01_015.seq
Sample name: K_{Tn}70_9/HopAO1

TACCcctTGtAtTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACAT
CAGAGATTTTTGAGACACAACGTGGCTTACTAGGATAGATCCGATATCGGTACCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACG
AACGGTAGAATTCTCTAGATGATCAGCGGCCGAGATCCGTTTTTCGCATTTATCGTGAAAC**CGCTTTCGC****GTTTTTCGTGC**
GCCGCTTCAGCCGGCCTCTGTAACGACTTCTCGCTCGCTCCGGACATTCAAATTTTTAGTTCTGTGTTGAGGATTAC
TTTTTTTACCTTTTACATAATTGGCATCGACCAACGTTAAAGACTTAGTGCGCTTCAGTTCTGTAATCATGGCACTTTCA
CGTGCCGCTCCGTCAACCTGGGATAGGCCGCGGTTGGCCCAATCCATCGGGCCACGTAAGGTGATAGGCAAAACCGTTGAC
AATCGCATGAGATTCTTCGCGCAGATCTAGTACGGTGAGCGGCCCGCTCCAAGCGCTGCGCGGATACTCTTCACCTGCT
CGACGGAAGAAATACGTTTACAAACAGCCAAATTCAGGTGCGGACAACCCGCCGTCTCCATTCCCAAAGGCAGTTTGCTC
AAGTCATTAGTGGTACGGAAGAAAGACATTTTGCCGTGTTGGGGGGGGGCATTTTGTCGATCACCATAACACATTGGTC
TTCGGTTTTCCCGAGGGGGCACCGCGTAGCGTAAGAGGACACGATTACCTAGATGCGTACGTTTCGCTCAAGCCAGAGG
ACGCTAGATCGTTGGCCGAGGGAGGACTGGATGCATCGATGGATATGGCTTCCGAACGGACATACAAATGAGCGCTGACG
ATGTCTACTCAAGTTGATCTTTTAATCGAAACGGAACGACAGCTCGCTCTCGATTAAATGACGGGGCCCGTGCCCTCG
GCGTAGCTGGTAGCATGGATACAAAATTGAAGTTTAAATTGCTCCTCCTAAGTCGATCACGGTATGACGTAGGAACCTACC
CGCCCTGTGCACGACGTTTCAATCCAGAGAATGAACCGGTTGGTGACGCGATAACGTCAGTTGAAGGCATCTTAAGCCT
GTGAACCGCTTGCTCTAATGCAACGAACTCTTGCTGATGACTGACGACAGATCATC

HopAO1-geenin sekvenssi jatkuu tähän suuntaan 3'-5'-muodossa
MuEnd Primer -alukkeen sekvenssi (**GTTTTTCGTGCGCCGCTTCA**)
K_{Tn}-transposonin sekvenssi jatkuu tähän suuntaan

Pst DC3000 *hopD1*::KTn (KTn16_pesäke107; sekvensoitu, sekvensointialuke KA1608)

Sample name: KTn16_107/HopD1

S1418_03_C01_005.seq

GCCTTTGTTTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAG
AGATTTTGAGACACAACGTGGCTTACTAGGATAGATCCGATATCGGTACCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAC
GGTAGAATTCTCTAGATGATCAGCGGCCGAGATCCGTTTTCGCATTATCGTGA**AACGCTTTCGCGCTTTTCGTGCGCC**
GCTTCATCAACAGCTCAGAAGCGCCAAGCTCCCATGCCGAGCCGAGTATGCTGCTGACCCCGATGCTGCCGGCTAGACCG
CCGAGCTGGAATTCCCTTCTTGGTGGCTACATGCAACAATTCCCTGTGCGCCCAGGCGAACCTGAAGATCGTCGTCCCCCTT
GAGTTTCTGGTTGATGAACTCGGAGAGGACATCGTCATTGGACGTGATCTTGGGAGCACATGAGGCGAGAAACGCTTTCG
CGCTATTCCTGGCCGATTGATGCGTTTGGACCAAATGCCGAGCCCCCGCTCGATGGCCTTGAGCAATAAGGGGATATGG
ATGTCTGCGTTGACATCCTCATCTACACGCTCCGACGAGTTGGCACCGGACATCAGTTGCGCCTTCACCACCGTGAAGGC
GCCTTTGAATTCCTCAAGTGCTTCTCAATATCCCGACGTGGCCCGCATTTCCAGCTGGACCCCGCAATGCTCGCGGCCT
GTGGTGGAAATGCCGTGGTCGGCTGCGCAAACGATAGCAGGgCCTGCACTACCGGGTTATCGGAAACAAGCTACCAGAG
TCCCTGCGGACCGACCCGATATGCACGGGCTTTGGCTGTGATgGCGGACGAGAATGGTCTGCGAGCTCAGTAACGGAGTT
CCAGCTACTGCTGTCTACTGCATCTTGTGAGAAGAACGCGACTCATACCTAGATGGTCGTACCTCAAGACAGAAGATGC
TGACATGTGCGGCGGGGGCTGTACGTGGAAGATTTGGCTTCCGAAAGGCATGCAATTGCCGACAGGTCTAATCGAATGAT
CATTATCGGCTGAACGTCAGCTGTATTATCAGTCGATTCCAGGATTCGTACCTGCACGTTGAGCTTAAGGATACCAGCG

HopD1-geenin sekvenssi jatkuu tähän suuntaan 3'-5'-muodossa

MuEnd Primer -alukkeen sekvenssi (**GTTTTTCGTGCGCCGCTTCA**)

KTn-transposonin sekvenssi jatkuu tähän suuntaan